

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-316210
 (43)Date of publication of application : 16.11.1999

(51)Int.Cl.

G01N 27/327
 G01N 33/566
 // A61K 39/395

(21)Application number : 11-014833

(71)Applicant : AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECHNOL RES INST LTD

(22)Date of filing : 22.01.1999

(72)Inventor : CORNELL BRUCE A
 BRAACH-MAKSVYTIS VIJOLETA L B
 PACE RONALD J
 KING LIONEL G
 RAGUSE BURKHARD
 BAXTER CLAIRE R
 HALL RUTH M
 MORRIS CAROL A
 OSMAN PETER D J

(30)Priority

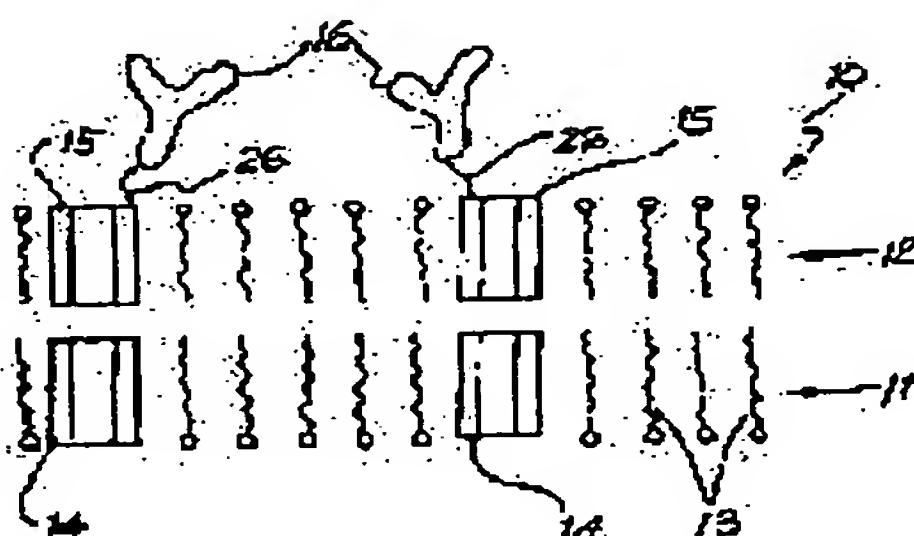
Priority number : 89 2441	Priority date : 27.01.1989	Priority country : AU
89 2469	30.01.1989	AU
89 2470	30.01.1989	AU

(54) RECEPTOR MEMBRANE AND GATING FOR IONOPHORE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an apparatus which is suitable for transplanting an ionophore into the body of the mammals by a method wherein amphipatic molecules and receptor molecules which are aggregated and arranged are contained in a membrane which covers the surface of the apparatus.

SOLUTION: An apparatus is surrounded by a membrane 10 which comprises an arrangement in which amphipatic molecules 13 are aggregated densely. At least a part of the amphipatic molecules 13 contains receptor molecules 16 which are coupled to a support. The receptor molecules 16 comprise a receptor part, and the molecules are selected from an antibody and an antibody fragment. The support is selected from a group composed of a lipid head-part group, a hydrocarbon chain, cross-linkable molecules and a membrane protein. For example, the membrane 10 is composed of a first layer 11 and a second layer 12, and the respective layers 11, 12 are composed of an arrangement of the amphipatic molecules 13. In addition, ionophores 14 and ionophores 15 are formed on the respective layers 11, 12. Terminals of the ionophores 15 are bonded to the receptor molecules 16 via linker groups 26. Since the ionophores 14, 15 are arranged longitudinally so as to form a channel, ions can pass the membrane 10.



[Date of request for examination] 22.01.1999
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 3293793
[Date of registration] 05.04.2002
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right] 05.04.2005

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-316210

(43)公開日 平成11年(1999)11月16日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 27/327

33/566

// A 6 1 K 39/395

識別記号

F I

C 0 1 N 27/30

3 5 1

33/566

A 6 1 K 39/395

Z

審査請求 有 請求項の数 8 OL (全 17 頁)

(21)出願番号 特願平11-14833

(62)分割の表示 特願平2-502496の分割

(22)出願日 平成2年(1990)1月29日

(31)優先権主張番号 P J 2 4 4 1

(32)優先日 1989年1月27日

(33)優先権主張国 オーストラリア (AU)

(31)優先権主張番号 P J 2 4 6 9

(32)優先日 1989年1月30日

(33)優先権主張国 オーストラリア (AU)

(31)優先権主張番号 P J 2 4 7 0

(32)優先日 1989年1月30日

(33)優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71)出願人 599011160

オーストラリアン・メンブレン・アン
ド・バイオテクノロジー・リサーチ・イン
スティチュート

オーストラリア国・2113・ニュー・ザウ
ス・ウェールズ・ノース・ライド・デリ
ー・ロード (番地なし)・シー/オー・コ
モンウェルス・サイエンティフィック・ア
ンド・インダストリアル・リサーチ・オ
ガニゼーション

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外8名)

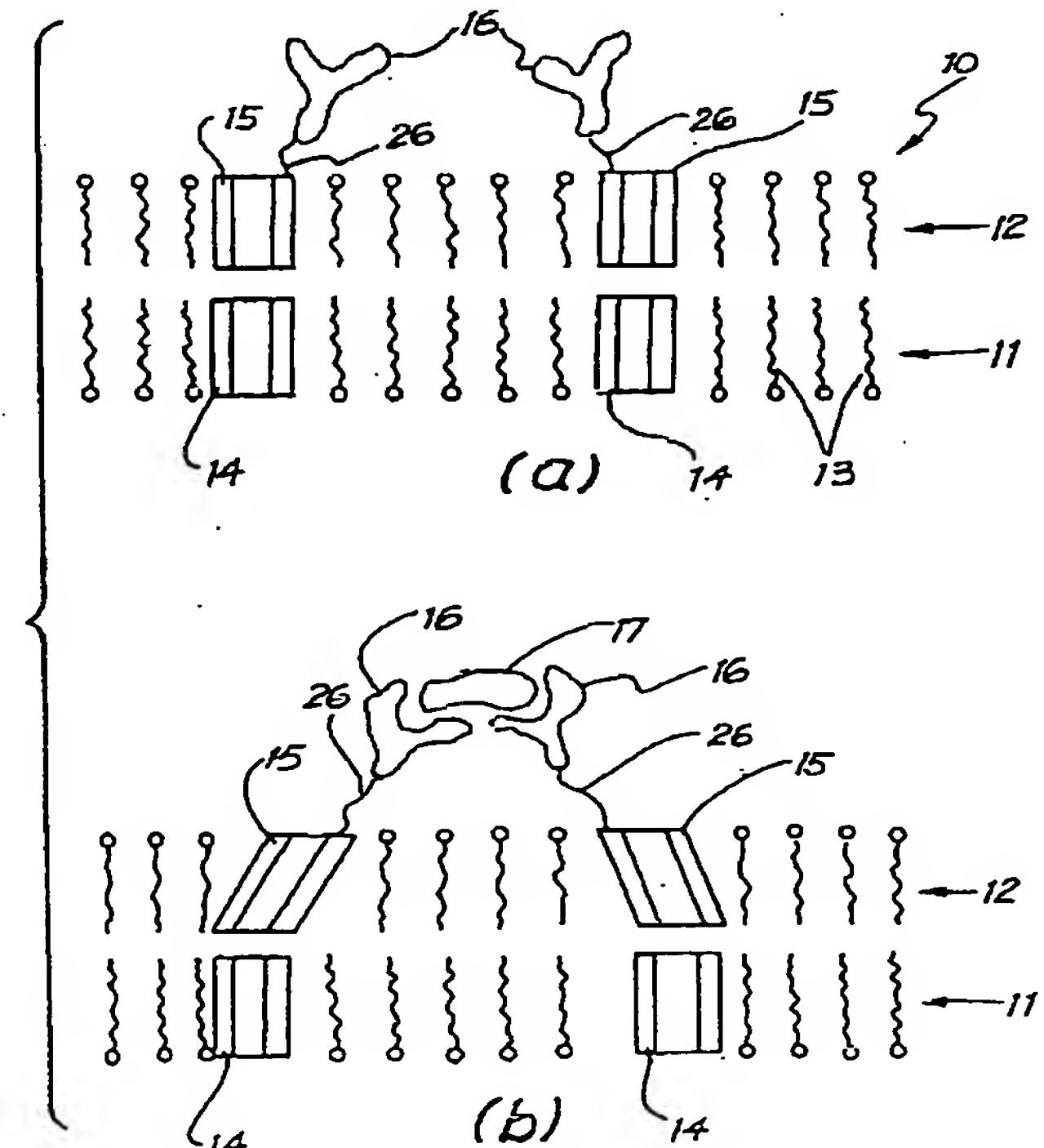
最終頁に続く

(54)【発明の名称】受容体膜およびイオノホアのゲーティング

(57)【要約】

【課題】 本発明は、哺乳類動物の体内への移植に適した装置を提供する。

【解決手段】 この装置は密に凝集した自己凝集性両親媒性分子と受容体分子とからなる膜によって被覆されたものである。受容体分子は、特定の細胞を膜へ結合を促進させるか、あるいは阻止する。特に好ましくは、受容体分子は、フィブロネクチン、ビトロネクチン、表皮細胞、または内皮細胞に対するものである。さらに好ましくは、装置を被覆している膜は、グラミシジンのような複数のイオンチャンネルを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳類動物に移植可能な装置であって、この装置はその表面を覆う膜を有し、この膜は両親媒性分子が凝集配列したものであり、前記両親媒性分子の少なくとも一部分は支持体に結合した受容体分子を含み、前記受容体分子は受容体部位を有し、前記受容体分子は抗体および抗体断片から選択され、前記支持体は脂質頭部基、炭化水素鎖、クロスリンク可能な分子、および膜タンパク質からなる群から選ばれ、前記支持体は前記受容体分子の前記受容体部位から離れた一端と結合し、これにより前記受容体部位が前記装置から離れた前記膜の表面上に配置されるか、その表面から突出した状態に配置され、前記受容体分子は特定細胞膜への結合または結合を拒むようにして設けられていることを特徴とする装置。

【請求項2】 請求項1に記載された装置であって、前記膜は複数のイオンチャンネルを含むものであることを特徴とする装置。

【請求項3】 請求項2に記載された装置であって、前記イオンチャンネルはグラミシジンであることを特徴とする装置。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載された装置であって、前記受容体分子はF(a b)₂またはFa bフラグメントであることを特徴とする装置。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載された装置であって、前記受容体分子はフィプロネクチン、ビトロネクチン、内皮細胞または表皮細胞に対するものであることを特徴とする装置。

【請求項6】 請求項5に記載された装置であって、前記受容体分子はファイブロネクチンに対するものであることを特徴とする装置。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載された装置であって、前記両親媒性分子はクロスリンク可能な部位を有するもので、この部位は他の分子のクロスリンク可能な部位とクロスリンクしていることを特徴とする装置。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載された装置であって、前記両親媒性分子は前記装置が移植されるべき哺乳類動物種に天然に存在する非細胞毒性の両親媒性分子、その誘導体、または合成両親媒性物質であり、かつ、パラジウム、チタニウム、プラチナ、銀または金からなる群から選択された金属表面に付着するためのチオール基を有することを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、それぞれの層にイオノホアが取り込まれており、膜のコンダクタンスがアナライトの存在または不在に依存することを特徴とする膜脂質二重層に関するものである。また、本発明は、抗体のFc領域に特異的に結合する受容体を有する膜に関

するものである。さらに、本発明は、哺乳類動物に移植する装置に関するもので、この装置の表面は受容体を含む膜によって被覆されることを特徴とする。

【0002】

【従来の技術】従来から、両親媒性分子は溶液中で凝集し、2次元の膜配列を形成することが知られている。この配列の形状は多様であり、例えば単一層、黒膜、ベシクルおよびリポソームがある。また、このような両親媒性分子の多くは交差結合（クロスリンク）する部分を有する。

【0003】したがって、紫外線照射や電離性放射線照射などのような適当な条件下で、両親媒性分子間のクロスリンクを行なわせることによって二次元配列を形成させて両親媒性分子間の重合をさせることができある。また、適当な受容体を両親媒性分子からなる配列に加えることも可能である。

【0004】膜を介したイオンの選択的または非選択的透過性は両親媒性分子からなる配列に存在する孔（ボア）またはチャンネルの数、大きさ、化学的特性等に依存する。また、これらのボアまたはチャンネルによって透過溶解分子（permeating solubilised molecules）の膜通過がなされる。また、イオノホアと呼ばれる分子を取り込んだ膜の場合、イオンの膜透過が促進される。

【0005】係属中の関連出願第WO89/01159号は、受容体を両親媒性分子とともに拡散させて、その受容体分子が取り込まれた膜を高特異的結合能を有するバイオセンサーの生産に好適な表面結合特性を有する膜として使用することについて開示している。また、そのようなことを可能とさせる適当な修飾を受けた受容体分子も開示している。さらに、この関連出願は、ポリペプチドからなるイオノホアのようなチャンネルを両親媒性分子とともに拡散させ、イオンの透過性に関して特定の性質をもった膜を形成させることについて開示している。そして、この関連出願は、アナライトの結合によるイオンチャンネルの開閉（これは膜のコンダクタンスに関係する）についても言及している。よって、本明細書に記載された内容は、関連出願第WO89/01159号に開示された内容を参考としている。

【0006】上記した多様な成分から形成された膜は、その膜構造を有する温度（T_c）以上で維持する。このような温度T_cは、遷移温度、溶解温度または相転移温度とも呼ばれている。このような膜に存在するイオンチャンネルおよび受容体は、脂質二重層の2つの層において拡散移動することが可能である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従来から免疫グロブリンは、特異性、親和性、多様性および安定性が高いため、分析用試薬として用いられてきた。抗原－抗体反応は、ラジオイムノアッセイ（RIA）や酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA：エリザ）などのような感度の高い診

断技術の基本となる。このことから、これらの技術は幅広く利用されているが、市販の抗体をベースとしたデスポーバブルな診断キットは、半定量的であり、かつ検査に時間を浪費するものである。また、このような診断キットは測定信頼性に欠けるものであり、さらに分析能力に限界がある。よって、求められる免疫学的アッセイシステムは、検査がすばやくでき、信頼性、特異性、感受性および定量性がすぐれたものでなくてはならない。

【0008】ラジオイムノアッセイやエリザは、通常、抗体をガラスまたはプラスチックの表面に非共有的に結合させて、その抗体をイモビライズ（固定）するものである。このことは、抗体の多くの結合部位が阻害されることになるので、その抗体の抗体活性が低下し、また残りの結合部位の数や親和性の正確な把握を困難とさせる。より最近になって、抗体結合部位の配置は、抗原結合部位より離れた基を介して一表面に、抗体または抗体断片、 $F(ab)_2$ および Fab の特異的結合によってなされるようになった。抗原と抗体との結合は、いろいろな方法によって検知することが可能であり、そのような方法には電気的測定方法も含まれる。しかし、それぞれ検知されるべき新しいアナライトを必要とし、アナライトに対する特異的抗体は、 $F(ab)_2$ および Fab 断片のさらなるリダクションが実施されるように多クローンからなる混合物から精製された親和性を有するものである必要がある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、抗原-抗体結合部位が隠れていないか、もしくは遊離したモノクローナル抗体または多クローナル抗体の抗原結合部分の配置に言及するものである。モノクローナルな状態は、決して抗原の検出に必要とされることではなく、また $F(ab)_2$ および Fab 断片のさらなるリダクションも必要とするものではない。検出されるべきアナライトに対して生じた抗体は、(B)両親媒性分子からなる自己凝集性単層膜または二重層に取り込まれた(A)アシル化抗体または抗体断片と結合する。また、受容体分子を含む膜を、移植装置の被覆に用いることが可能であると考えられる。そして、そのような被覆は、その表面が生体親和性を有するものであることが望ましい。

【0010】生体親和性表面は、侵襲的な人工装置ならば、どれでも必要とされる。装置の種類と、それを移植される生体の部位に依存して、人工装置はその表面が特定の細胞に対して接着性が高く、かつ他の細胞に対しては反発的な性質をもつ必要がある。なぜなら、フィブリノーゲンのような血漿タンパク質の吸着または赤血球のような細胞の付着は血栓症を引き起こすであろうし、また細胞の表面への吸着は組織形成につながることから、これらは外来物質表面と組織との間に好ましくない隔壁を形成してしまうことになる。しかし、侵襲的な人工代用器官を体内へ入れるという観点からみれば、細胞表層

接着物質は人工代用器官を媒体とした生体内への細菌感染に対する防御壁としての役割もある。

【0011】侵襲的な装置の表面と特定の細胞との間の好適な接着を行なわせる一方で、好ましくない細胞や血漿タンパク質との結合を阻止するために、フィブロネクチンやビトロネクチンのような細胞表層結合タンパク質を介して上皮細胞や内皮細胞のような特定の細胞と移植装置表面との接着を促す。

【0012】本発明が第一に目指すものは、アナライトの存在または不在に依存した膜伝導性を有する膜からなり、両親媒性分子の密に凝集した配列と、第一および第二半膜貫通モノマーからなる複数のイオノホアと、少なくとも第二半膜貫通モノマー上に設けられ、かつアナライトまたはその一部分と結合可能な第一受容体分子とからなる膜を提供することであり、少なくとも第二半膜貫通モノマーは膜内を側方拡散可能なものであり、また第一受容体分子へのアナライトの結合は、第一半膜貫通モノマーと第二半膜貫通モノマーとの相互関係を、イオノホアを介した膜のイオン透過を許すかまたは阻止するよう変化させることを特徴とする。

【0013】よって、本発明の好ましい実施態様は、第一および第二層からなり、この第一層には第一半膜貫通モノマーが設けられ、また第二層には第二半膜貫通モノマーが設けられている。

【0014】半膜貫通モノマーは既知の分子からなるものであるが、好ましくはこの分子はグラミシジンAモノマー、アンホテリシンB、そしてそれらの組み合わせたものとからなる群から選択されるものである。もっとも好ましいモノマーとしては、グアジジンAモノマーが挙げられる。

【0015】本発明の第一目的に沿った好ましい実施態様では、第一層にある第一半膜貫通モノマーは第一層での側方拡散が阻害されているが、第二層にある第二半膜貫通モノマーは第二層での側方拡散が可能である。

【0016】第一層にある第一半膜貫通モノマーの側方への拡散を阻害する方法は、いくつかの既知の方法にが知られているが、モノマーおよび両親媒性分子のそれぞれが、他の分子にある少なくとも一つの対応する部位にクロスリンクした少なくとも一つの部位を有するか、もしくはそのように修飾された分子であることが望ましい。適当な刺激、例えば紫外線照射や電離性放射線によってクロスリンク可能な部位が重合して膜内においてひとつの層にクロスリンクした状態となる。

【0017】本発明の第一目的に沿ったより好ましい実施態様では、第一層およびそれに含まれるモノマーが固体支持体に固定されることによって第一層にある第一半膜貫通モノマーは第一層での側方拡散が阻害される。このことは、第一層の両親媒性分子上に固体支持体またはその支持体上の該当する基と反応する基を設けることによってなされる。

【0018】本発明の目的に沿ったさらに好ましい実施態様では、膜は複数の受容体部位を有する複数の第二受容体分子を有する。また、第二受容体分子は膜内を側方に拡散することが妨害されていることが好ましい。膜が二重層である場合、第二受容体分子は第二層に、受容体部位が第二層において第一層から離れた外側方向に突出していることが好ましい。

【0019】ここで用いられる「受容体分子」という用語は、幅広い意味を含むものである。すなわち、この受容体分子は目的とするアナライトに結合するならばどのような化学物質でもよい。また受容体分子は、他の分子を認識するものならばどのような化合物または組成物でもよい。天然の受容体としては、抗体、酵素、レクチン、色素、キレート剤などが含まれる。例えば、抗原に対する受容体は抗体であり、一方抗体に対する受容体は抗-抗体、または好ましくは特定の抗体によって認識される抗原である。さらに、カルシウムのようなイオンに対する受容体はEDTAのようなキレート剤が受容体となる。

【0020】第一および第二受容体分子は、同一の分子あるいは異なる分子であり、好ましくは多クローン抗体またはモノクローン抗体、少なくともひとつのFabフラグメントを含むそれらの断片、抗原、レクチン、ハプテン、キレート剤および色素からなる群、より好ましくは抗体またはその断片からなる群から選択される。また、第一受容体分子および付加的に第二受容体分子はアナライトと結合する2つの結合部位を有することが好ましい。

【0021】第二受容体分子は、好ましくは抗体または少なくともひとつのFabフラグメントを含む断片または抗原である。受容体がFabフラグメントまたは抗体である場合、これはWO89/01159の出願に記載されている支持体と結合するであろう。

【0022】この第二受容体は第二層での側方拡散を既知の手段によって妨害される。このような既知の手段とは、例えば第二層にある両親媒性分子への受容体分子のクロスリンクである。受容体分子が支持体に結合す場合、受容体の側方拡散は第二および第一層の両層に延びた支持体を有することによって阻止することが可能である。

【0023】本発明の膜がバイオセンサーに利用される場合、膜を固体表面に張り付け（付着、結合）することが望ましい。これは、膜内の両親媒性分子上に固体表面との反応性を有する分子を与えることによってなされる。好ましい固体表面として、ヒドロゲル、セラミックス、酸化物、シリコーン、ポリマーおよび遷移金属が含まれる。好ましい遷移金属は、金、プラチナおよびパラジウムである。固体表面への膜の付着は、非共有結合または共有反応によってなされる。例えば、固体表面上のビニル基は、ビミル末端を有する脂質と共に重合する。また、

硫黄末端を有する脂質は金属基質（例えば金またはパラジウム）に粘着する。さらに、脂質を支えるために凝縮または付加反応が利用される。もし必要ならば、固体基質の修飾を行なう。これはシリル化またはシリカ表面のような既知の方法によってなされる。膜が二重層である場合、第一層は固体表面に付着する。

【0024】好ましくは、第二層は相転移温度を持つように選択され、膜がこの相転移温度よりも低い温度に冷却された場合に第二層で相分離が生じて第一および（または）第二受容体分子に結合したアナライトが遊離される。これは、試験後の装置の「リセット」を行なう簡易方法を提供する。

【0025】本発明のこの目的に沿った好ましい実施態様では、第一受容体はリンカー基によってイオノホアに付着する。このリンカー基は、典型的にスペーサー基とひとつ以上の反応基とからなる。スペーサー基はイオノホアに付着され、そして反応基は受容体分子への付着を担う。スペーサー基は、炭化水素、エチレンギリコールのオリゴマー、オリゴペプチド等からなり、また受容体分子がカップリングするとイオノホアがイオンを透過させるような長さからなるものである。反応基は、N-ヒドロキシサクシニドエステルまたはタンパク質のアミノ基と共有結合する他の活性エステル、酸化糖残基に結合するヒドラジン誘導体；チオール基に共有結合するマレイイミド誘導体；ビオチン；ストレプトアビシンまたは抗体からなる。

【0026】リンカー基はいくつかの反応基、例えば本発明の好ましい一実施態様によればリンカー基は一方でストレプトアビシンに結合するビオチンに結合する。この特定のリンカー基では、受容体分子はビオチニル化抗体に結合し、抗体上のビオチンはストレプトアビシンに結合する。

【0027】本発明のより好ましい実施態様では、リンカーの末端反応基は抗体のFc部分に対して特異的な抗体または抗体断片である。そのような末端反応基は、アナライトに対して特異的な受容体分子である抗体のFc領域に結合するであろう。本発明のより好ましい実施態様では、第二受容体分子は同様のリンカー基を用いている膜に結合する。

【0028】本発明の好ましい実施態様では、分離した第二半膜貫通モノマー上の第一受容体分子はアナライト上の異なる部位に結合する。それによってアナライトへの第一受容体の結合は膜を横切るイオンの流れを阻止する。本発明のより好ましい実施態様では、分離した第二半膜貫通モノマー上の第一受容体分子はアナライト上の異なる部位に結合して膜を横切るイオンの流れを阻害するが、アナライトを添加することによって第一受容体分子と添加されたアナライトとが競合的に結合するので、膜を横切るイオンの流れを可能とする。

【0029】さらに本発明のより好ましい実施態様

では、少なくとも両親媒性分子の一部分は膜貫通両親媒性物質で、これは古細菌脂質または尾部と尾部とが化学的に結合した二重層両親媒性物質である。膜が単層として存在する実施態様では、すべての両親媒性分子は膜貫通両親媒性物質である。

【0030】上記したように、リンカー分子上の好ましい末端反応基のひとつは、 streptavidin である。多価の反応基を使用する場合、リンカー基はクロスリンク不可能であることが重要であり、このことによっていかなるアナライトも存在しない状態で第一層にあるイオノホアと第二層にあるイオノホアとの相互関係が変わること。

【0031】したがって、 streptavidin のような分子が末端反応基として使用された場合、他のリンカー基上にもうけられたビオチンとのクロスリンクする streptavidin の能力が阻害される。このことは、ビオチン結合部位に隣接する streptavidin のビオチン結合部位によって確かめられ、それによって streptavidin はビオチンに再配列されたリンカー基に結合する。これは、 streptavidin を適当な量からなるビオチンと事前にインキュベーションすることによって達成される。

【0032】競合的な影響が存在しない場合、平均的には、第一および第二層のそれぞれのイオノホアは、イオンの膜通過を許す完全なチャンネルを作るために配列する。第二層にあるイオノホアが第一層にあるイオノホアとの配列から外に拡散したとすると、チャンネルは壊れてしまいイオンは膜を通過しなくなる。このような配列に加えて、適当な膜に取り込まれた場合においてイオノホアの拡散は、アナライトからなるひとつの单一分子のような小さなものを検出可能であろう。アナライトからなるひとつの单一分子の結合は、完全なイオンチャンネルの形成（イオンの膜通過を許す）または崩壊（イオンの膜通過を停止する）を引き起こす。このような変化が適当な時間経過すると、イオンの膜通過は受容体へのアナライトの結合のシグナルとして検出される。ひとつの单一イオノホアにもとづく膜を横切る電流の測定は、すでに知られており、またその電流は 4 pA / チャンネルである。

【0033】本発明が第二に目指すものは、アナライトの存在または不在に依存した膜伝導性を有する膜で、両親媒性分子の密に凝集した配列と、複数の膜貫通ヘリカルペプチド凝集イオノホアとからなるもので、イオノホアは複数の膜貫通ヘリカルペプチドモノマーを有し、それぞれのモノマーがアナライトに対する反応性を有する受容体分子を設けていることを特徴とする膜を提供することである。アナライトの受容体分子への結合は、膜貫通ヘリカルペプチドの凝集を妨害する。

【0034】本発明のこのような目的に沿った好ましい一実施態様では、膜貫通ヘリカルペプチドモノマーはア

ラメチシンモノマーである。

【0035】本発明のこのような目的に沿ったより好ましい実施態様では、受容体分子は多クローニングまたはモノクローニング抗体、少なくともひとつのが F(ab) フラグメントを含む抗体断片、レクチン、ハプロテイン、キレート剤および色素からなる群から選択されるものである。しかし、ここでは受容体分子は少なくともひとつのが F(ab) フラグメントを含む抗体断片が好適であり、またより好ましくはひとつの F(ab) フラグメントである。

【0036】膜は、二重層または单層として存在する。膜が单層の場合、両親媒性分子は膜貫通両親媒性物質、例えば古細菌脂質または尾部間が化学的にリンクされた二重層両親媒性物質であることが望ましい。

【0037】本発明が目的とする膜がバイオセンサーとして利用される場合、膜は固体表面に付着されることが好ましい。このことは、固体表面に対する反応性がある基を膜の両親媒性分子上に設けることによって達成される。好ましい固体表面としては、ヒドロゲル、セラミック、酸化物、シリコン、ポリマーおよび遷移金属がある。好ましい遷移金属は、金、プラチナおよびパラジウムである。固体表面への膜の付着は、共有反応または非共有的相互作用によってなされる。

【0038】本発明のこのような目的に沿ったより好ましい実施態様では、受容体分子はリンカー基を介して膜貫通ヘリカルペプチドに付着している。このリンカー基は、すでに述べた本発明の第一目的のところに記載されたものと同じである。

【0039】すでに知られているように、アラメチシンイオノホアは伝導性イオノホアを形成するようにして凝集した複数のアラメチシンモノマーからなる。膜内でのアラメチシンの凝集／結合は、これらのモノマーがアナライトと結合する受容体とともに提供された場合に阻害される。

【0040】本発明が第三に目指すものは、アナライトの存在または不在に依存した膜伝導性を有し、かつ自己凝集性両親媒性分子の密に凝集した配列からなる膜を提供することである。自己凝集性両親媒性分子の少なくとも一部分は、支持体と結合した受容体分子で、この受容体分子は抗体の Fc 領域と反応性があり、かつ受容体部位を有する。受容体分子は、Fc 受容体、抗体、F(ab)₂ および F(ab) フラグメントの Fc 結合ドメインからなる群から選択されるもので、また支持体は脂質頭部基、炭化水素鎖、クロスリンク可能な分子および膜タンパク質からなる群から選択される。この支持体は受容体分子と受容体部位から離れた端で結合する。アナライトに対する反応性のある抗体分子は Fc 領域によって受容体分子に結合する。

【0041】ここで用いられている「Fc 受容体」とは、免疫グロブリンの Fc 領域に対して反応性のある細胞膜受容体を意味する。本発明のこのような目的に沿つ

た好ましい実施態様では、受容体分子は多クローン抗体から好適に得られる。ここでは、受容体分子はアミノ酸側鎖または炭化水素部分を介して支持体に共有的に付着する。

【0042】本発明のより好ましい実施態様では、支持体に結合した受容体分子は膜の二重層または单層の中を側方拡散する。本発明のより好ましい実施態様では、アナライトと反応性のある抗体はモノクローナル抗体である。ここでは、アナライトと反応性のある抗体は、好ましくは同一アナライトに存在する異なるエピトープに対する2つ以上の異なるモノクローナル抗体からなる。

【0043】当業者に容易に理解されるように、種特異的抗体のFc部分に直接反応する受容体分子を用いて、例えば抗マウスFc抗体または抗マウスFc抗体Fab断片のFc(a b)₂を用いて、本発明の膜をどのようなマウス抗体にでも使用可能とすることができる。

【0044】本発明にもとづく膜は、通常、抗マウスFc抗体のような種特異的抗体のFc部分に対して生ずる抗体をまず調製される。このようなFc抗体断片(B)を抗体断片として用いて、その抗体断片の末端アミノ酸側鎖または炭化水素部分を介して支持体に共有的に結合させ、そして自己凝集的両親媒性单層または二重層に取り込む。目的とするアナライトに対して生じた検出されるべき抗体(A)は、モノクローナル抗体または多クローン抗体である。抗体(A)は、单層または二重層に取り込まれた抗Fc抗体断片(B)によってFc領域を介して自己凝集的单層または二重層に結合する。

【0045】受容体分子がFc受容体のFc結合ドメインである場合、Fc受容体はFcδRIまたはFcδRIIまたはFcδIIIとして知られている受容体クラスから選択される。特に、Fc受容体が免疫グロブリンGのFc部分に対して反応性があることが好ましい。

【0046】上記したように、Fc受容体のFc結合ドメインだけが使用されるか、必要に応じてransmembrane domainとともに使用される。この部分が全受容体分子を単離することによって生ずる一方で、遺伝子工学的技術を用いてransmembrane domainとともに細胞外Fc結合ドメインまたは細胞外Fc結合ドメインを作ることが望ましいと考えられる。これを達成するために、Fc受容体をコードするクローン化された遺伝子を関連したひとつまたは複数のドメインを産生するように修飾する。もちろん、これは遺伝子配列の一部を削除することが含まれる。

【0047】また、Fc受容体および抗体に対して遺伝子配列をさらに修飾することも考えられる。これらのこととは、例えば、膜分子と、Fc受容体または抗体結合ドメインとの化学的なクロスリンクのために、Fc受容体の細胞外ドメイン、または抗体に対してスルフィドリル基を与えるシステイン残基を含むひとつまたはそれ以上のアミノ酸添加が必要とされる。このことは、部位特異的

突然変移によって達成される。

【0048】また、Fc結合ドメインをコードする遺伝子配列を修飾して、抗体結合に対する受容体の親和性の増加および(または)FcσRI、FcσRIIおよび(または)FcσRIIIに結合される免疫グロブリンG分子の範囲の増加を図ることが考えられる。さらに、抗体結合ドメインの遺伝子配列を修飾して結合親和性を増加させることができる。

【0049】膜の脂質マトリックスは、抗体の取り込みと、それぞれの抗体分子の適切な配列を可能とする。この自己凝集された单層または二重層は、ラングミュア・プロジェクト方法、リポームまたはBLMのような既に知られている方法によって形成される。

【0050】好ましくは、抗原結合反応を検出するには、ransductionの測定によってなされる。本発明の膜が金属、ポリマーまたはヒドロゲルのような伝導性固体支持体に付着することが好ましい。検出機能は、抗原・抗体結合を検出できる伝導性固体支持体の選択によって達成される。この結合の検出は、伝導性固体支持体表面上の膜にある両親媒性分子からの抗体・抗原複合体の好ましい相分離に依存するであろうことから、むき出しの伝導性固体支持体は液体環境にさらされてransduction測定値の変化をもたらす。膜に取り込まれかつ自由に拡散する抗体断片に結合した抗体の相分離は、同一のアナライトに対して生じた少なくとも2つの異なる抗体による目的とする抗原への結合に依存する。2つまたはそれ以上の抗体の結合は、抗体のクラスター形成を引き起こさせる。このことは、抗体を与える单層または二重層の相が液体環境に対して「漏れ易い(リーkey)」ことを示している。この「漏れ易さ」は、伝導性固体支持体のransduction特性を変化させ、膜による液体環境からの絶縁をもはや維持することができなくなる。

【0051】膜に存在する抗体の密度は、抗体を支持するものと両親媒性物質との比の変化によって変化する。本発明の膜の安定性の増加は、膜を固体支持体に置くことによって達成される。選択された固体支持体の適当な処置は、両親媒性物質の炭化水素鎖と固体支持体との共有的な結合を可能とする。膜に用いられる両親媒性物質の選択は、抗体の結合に対して、既に知られているように、固体支持体の单層または二重層が分裂してその表面がリーkeyとなる。この装置は、試験溶液に存在する抗体の選択された最小量に全か無かの反応を示すように設計されよう。まとめると、本発明のこのような側面は、アナライト検出のための受容体として抗体を最低限度調製して取り込むことによって調製される膜を提供する。

【0052】本発明の膜は、抗体分子を用いた現存装置に対して以下のような利点を有する。

1. すべての抗体分子に対して抗体結合部位の適切な配置が、自己凝集した両親媒性单層または二重膜の内在成

分に結合することによって達成される。

2. 膜内の受容体分子の密度を調整することが可能であり、そのことから目的とするアナライトの最も感度の高い検出に最適である。

3. 抗Fc特異的受容体分子を有する本発明にもとづく膜は、抗体をモノクローナンにしなくとも、またF(ab)₂またはFabフラグメントにしなくても、膜に用いられるために選択されたものに対するどのような抗体の使用も可能にする。

4. 電気的な測定は、同一のアナライトに結合する2つまたはそれ以上の抗体の凝集によって起こる抗原結合の変化と单層または二重層の相分離とを検出する伝導性固体支持体を用いた結合アッセイにおいてすばやく結果を出すことを可能とする。

【0053】本発明が第4に目ざすものは、哺乳類の体内に移植するのに適した装置であり、この装置は、両親媒性分子の密に凝集した配列を有する膜によって囲まれたものである。この両親媒性分子の少なくとも一部分は支持体に結合した受容体分子を含むものである。この受容体分子は、受容体部位を有し、またこの分子は抗体および抗体断片から選択されるものである。支持体は脂質頭部基、炭化水素鎖、クロスリンク可能な分子および膜タンパク質からなる群から選ばれる。支持体は、受容体部位から離れた一端で受容体分子と結合する。この結合は、受容体部位が装置から離れた膜表面上に置かれるか、そこから突出したかたちでなされる。受容体分子は、特定の細胞の膜への結合または結合を拒むようにして設けられる。

【0054】このような目的に沿った本発明の好ましい実施態様では、膜はまた複数のイオンチャンネルを含む。このイオンチャンネルはβヘリックスを形成するペプチドであることが好ましい。また、より好ましくはそれはグラミシジンであることが好ましい。

【0055】本発明の第二の目的に沿った好ましい実施態様では、受容体分子はF(ab)₂またはFabフラグメントである。また、好ましくは受容体分子はフィブロネクチン、ビトロネクチン、内皮細胞または表皮細胞であり、より好ましくはフィブロネクチンに対するものである。

【0056】本発明のより好ましい実施態様では、装置表面またはその表面に設けられた基と反応する基を膜に設けることによって装置への膜の付着がなされる。さらに、本発明にもとづく他の実施態様では、受容体分子はF(ab)₂またはFabフラグメントであり、それらの末端スルフヒドリル基を介して支持体に結合する。

【0057】本発明の他のより好ましい実施態様によれば、両親媒性分子およびイオンチャンネルおよび(または)受容体分子はと支持体とからなる結合体は、それぞれのクロスリンク可能な部位が他の分子のクロスリンク可能な部位とクロスリンクすることによって形成される。

【0058】本発明では、装置の生体適合性は、その装置が移植される哺乳類種において天然に存在する両親媒性分子またはその誘導体またはその人工合成産物をパラジウム、チタニウム、プラチナ、銀または金のような金属との結合に関与する基とともに用いることによって強化される。このような両親媒性物質を用いることは、宿主-装置拒絶反応の度合いを減少させることにつながる。また、装置が移植される哺乳類種から生じた抗体または抗体断片を用いることによっても宿主-装置拒絶反応の度合いを減少させることにつながる。あるいは、抗体断片に対する抗体を修飾して拒絶を減少させる。

【0059】内皮細胞または表皮細胞への結合は、移植可能な装置を一定方向にアシル化された抗体または抗体断片を取り込んだ重合化または重合化されていない両親媒性物質からなる自己凝集性单層または二重層によって被覆することによって促進される。フィブロネクチンまたはビトロネクチンのような細胞表層結合タンパク質に対して生じた抗体または抗体断片を使用することによって、それを被覆された移植可能な装置の内皮細胞または表皮細胞との結合が促進される。そのような表皮細胞または内皮細胞によって被覆された装置の表面は、哺乳類の体にとって外来表面とは認識されず、血栓や組織形成を引き起こすような強い血小板粘着を防ぐことが可能となる。細胞表面結合は、体内へ挿入されたカテーテルによる細菌感染をふせぐことも可能とする。抗フィブロネクチン抗体および内皮細胞または表皮細胞に対する他の抗体はすでに知られており、またそれらは種特異的である傾向がある。

【0060】上記したように、自己凝集性单層または二重層は天然の脂質分子またはその誘導体からなるものであることが望ましい。抗体または抗体断片の両親媒性物質に対する特異的なクロスリンクは、それぞれの抗体が適切に配置されていることを保証する。すなわち、すべての部位が抗原へ結合可能であるということであり、このことによって結合密度を調整することが可能である。

【0061】本発明のさらなる利点は、膜にイオンチャンネルが設けられることによって、イオンが装置へ向けて膜を通過することが可能となる。脂質のような両親媒性物質は、移植可能な装置の被覆のための生体適合マトリクスを提供し、またイオンチャンネルが取り込まれることによって電荷の移動のための透過性が与えられる。いくつかのイオンチャンネルを用いることが可能であるが、本発明ではグラミシジンをイオンチャンネルとして用いた。特に、グラミシジンAおよびその類似体が好ましい。

【0062】グラミシジンAのようなイオンチャンネルの取り込みは、移植可能な装置表面に抗細菌性を与える。これはグラミシジンの抗細菌作用にもとづくものである。両親媒性物質およびイオンチャンネルから構成される自己凝集性单層または二重層に抗内皮または抗表皮

抗体が存在することによって、電荷の移動過程を阻害することなく血小板の粘着または組織形成を阻害することができる。このことから、そのような膜は、電荷の移動にもとづいて検出または適用される一方で、組織形成が生じず、また血栓を生じさせないような表面が必要とされるペースメーカーなどのような電極を有する移植装置と組み合わせられて使用される。

【0063】当業者に十分理解されるものであるが、本発明の第一の目的に沿った膜のコンダクタンスは、アナライトの存在に依存したイオノホアのゲーティングに依存する。このゲーティングは、他の層のイオノホアと関連したひとつの層のイオノホアが配置変換されることによって起こる。このようなゲーティング機構は、3つのタイプが可能である。すなわち、「局部的な崩壊によるゲーティング」、「側方向配置変換によるゲーティング」および「縦方向分裂によるゲーティング」である。

【0064】

【発明の実施の形態】これらの3つのタイプのゲーティング機構をより詳細に理解するために、本発明の第一の目的に沿った好ましい実施態様を添付した図面を参照しながら説明する。

【0065】図1は、本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの結合によって、局部的な崩壊によるゲーティングが起こり、膜コンダクタンスは減少する場合を説明するものである。図2は、本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって側方配置転換によるゲーティングが起こり、膜コンダクタンスが減少する場合を説明するものである。図3は、本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって縦方向の分裂が起こり、膜のコンダクタンスが減少する場合を説明するものである。

【0066】図4は、本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって側方配置転換が起こり膜のコンダクタンスが上昇する場合を説明するものである。図5は、修飾されたグラミシジンを合成するための反応スキームを説明するものである。図6は、本発明の第一態様にもとづく膜のインピーダンス測定結果を示すものである。図7ないし図9は、本発明の第一態様にもとづく膜のゲーティングを示す実験結果を示すものである。

【0067】図1を見ればわかるように、膜10は第一層11と第二層12とからなり、それぞれの層は両親媒性分子13の配列からなる。また、第一層11と第二層12にそれぞれイオノホア15および14が設けられている。イオノホア15の末端はリンカー基26を介して受容体分子16と結合している。アナライトが存在しない場合(図1(a)の場合)は、イオノホア14と15が縦列してチャンネルを形成するので、イオンは膜を通過することが可能となる。

【0068】図1(b)に示すように、アナライト17を添加すると、このアナライト17は受容体分子16に結合する。その結果、受容体分子間のクロスリンクが生じてイオノホア14と15との縦列配置が局部的にズレることになる。このため、イオノホア14および15による膜のイオン透過が阻害される。

【0069】図2では、膜10は第一層11と第二層12とからなり、それぞれの層は両親媒性分子13の配列からなる。また、第一層11と第二層12にそれぞれイオノホア15および14が設けられている。しかし、第一層11に設けられたイオノホア14は図中符号25によって示されたクロスリンク25によって側方拡散が妨害されている。イオノホア15の末端にはリンカー基26を介して第一受容体18が結合されている。また、第二受容体19は第二層12に内在するようにして設けられており、また側方拡散が阻害されている。アナライトが存在しない場合(図2(a)の場合)、イオノホア14と15が縦列してチャンネルを形成するので、イオンは膜を通過することが可能となる。

【0070】アナライト20を添加することによって、これらのチャンネルが壊れることになる。すなわち、図2(b)に示すように、アナライト20は第一受容体18と第二受容体19とに結合する。第二受容体19は第二層20内を側方拡散することができないので、第二受容体19に結合したアナライト20の第一受容体18への結合はイオノホア15を動かしてイオノホア14との縦列配置を壊す。この様式を「側方向配置転換によるゲーティング」と呼ぶ。

【0071】図3では、膜10は第一層11と第二層12とからなり、それぞれの層は両親媒性分子13の配列からなる。また、第一層11と第二層12にそれぞれイオノホア15および14が設けられている。イオノホア15の末端にはリンカー基26を介して第一受容体21が結合されている。アナライトが存在しない場合は、イオノホア14と15が縦列してチャンネルを形成する。

【0072】アナライトを添加することによって、イオノホア15および第二層12は、イオノホア14および第一層11から引き離される。これによって第一層11と第二層12との間に空間が生じ、チャンネルはもはやイオンの膜透過を実施できなくなる。このようや様式からなるゲーティング機構を縦方向分裂によるゲーティングと呼ぶ。

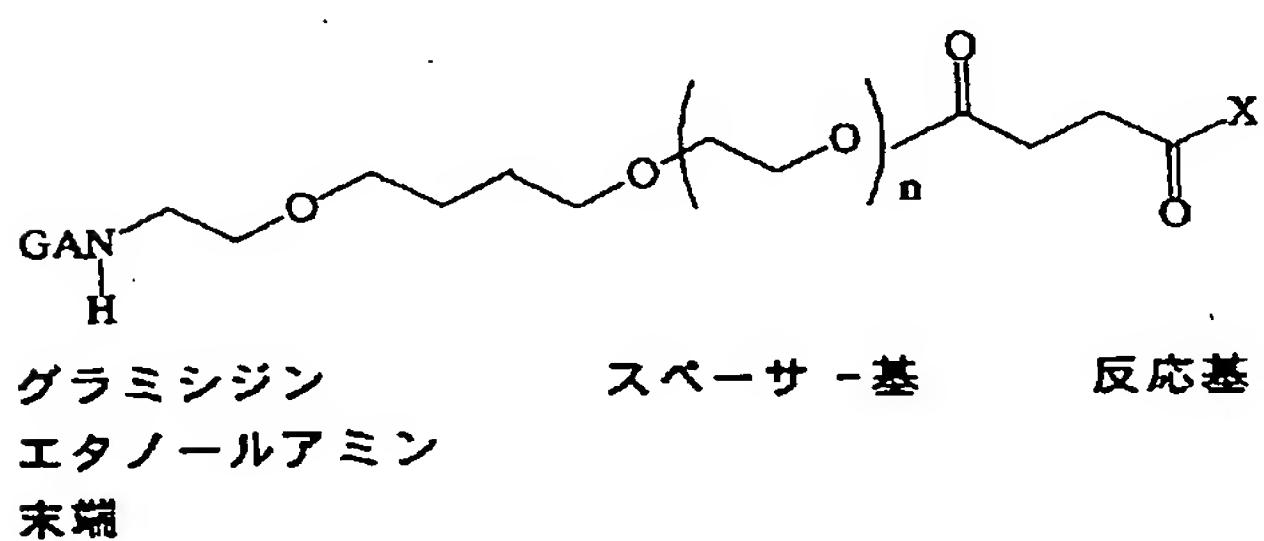
【0073】別のタイプの側方向配列変換によるゲーティングを図4に示した。図4(a)に示すように、膜10は第一層11と第二層12とからなり、それぞれの層は両親媒性分子13の配列からなる。また、第一層11と第二層12にそれぞれイオノホア15および14が設けられている。イオノホア14は第一層11内の側方拡散を図中符号25によって示されたクロスリンクによって阻害されている。また、イオノホア15の末端には

リンカー基26を介して第一受容体22が結合されている。アナラトが存在しない場合(図4(a)の場合)、イオノホア14および15は、第二受容体23と第一受容体22とが結合しているために一直線上に縦列されていない。この場合、第二受容体23は検出されるべきアナライトまたはその類似体である。

【0074】図4(b)に示すように、第一受容体22は第一受容体23から離れ、そしてイオノホア15は側方向拡散してイオノホア14と一直線上に縦列される。これによって、チャンネルが形成されるので、イオノホア14および15による膜のイオン透過が可能となる。本発明の姿をより詳細に理解するために、以下の実施例にもとづいてその好ましいかたちを説明する。

【0075】実施例1：リンカー・グラミシジン

【化1】



ースペーサー基は、炭化水素、エチレングリコールのオリゴマー、オリゴペプチド等で、レセプター分子がカッティングした際にグラミシジンがイオンを導くことが可能な長さからなるものである。

反応基は、N-ヒドロキシサクシミドエステルまたはタンパク質のアミン基に共有結合するための活性化工ステル、酸化糖残基に結合するためのヒドラジン誘導体、またはチオール基に共有結合するためのマレイイミド誘導体、ビオチン、ストレプトアビシンまたは抗体からなるものである。

【0076】タンパク質結合のための修飾グラミシジンの合成

1. 化合物1(スキーム1を見よ)

コハク酸無水物(2g)とベンジルアルコール(2.2g)とをピリジン(10mL)に溶解して45°Cで18時間加熱した。冷却混合物を塩化水素酸(1M, 200mL)に注いで、ジクロロメタン(3×50mL)で抽出した。化合したCH₂C₁₂抽出物を乾燥(Na₂SO₄)させ、そして蒸発させて白色固体からなる化合物1(2g)を得た。

【0077】2. 化合物2

化合物1(2g)を80チオニルクロライド(10mL)とともに3時間、室温で攪拌した。過剰のチオニルクロライドは蒸留処理し、残留物をテトラエチレングリ

コール(25mL)およびピリジン(20mL)で処理して、24時間攪拌した。混合物を塩化水素酸(1M, 300mL)に注いで、CH₂C₁₂(3×50mL)で抽出した。化合したCH₂C₁₂抽出物を乾燥(Na₂SO₄)させ、そして蒸発させた。残留物はエチルアセテートを抽出液として用いたシリカゲルによって濾過し、淡黄色油(1.2g)を得た。

【0078】3. 化合物3

化合物2(0.5g)とコハク酸無水物(0.2g)をピリジン(2mL)に混合し、24時間攪拌した。この混合物を塩化水素酸(1M, 100mL)に注ぎ、ジクロロメタン(3×30mL)で抽出した。化合したCH₂C₁₂抽出物を乾燥(Na₂SO₄)かつ蒸発させて淡黄色油(0.5g)として化合物3を得た。

【0079】4. 化合物4

グラミシジン(0.112g)、化合物3(0.307g)、ジクロロヘキシルジニミド(0.13g)、そして触媒量からなる4-(N,N-ジメチルアミノ)-ピリジンを乾燥ジオキサン(10mL)に混合して24時間攪拌した。過剰のジオキサンを減圧下で除去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール/水/トリエチルアミン 400:42:4:1エルート)にかけて、白色固体(0.53g)として目的化合物を得た。

【0080】5. 化合物5

化合物4(0.02g)をエタノールに溶解し、10%パラジウム/チャーコールを添加した。そして、混合物は1気圧、2時間の条件で水素存在下で水素添加した。そして、混合物を濾過し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール/水/トリエチルアミン 400:42:4:1エルート)にかけて、白色固体(0.19g)として目的化合物を得た。

【0081】6. 化合物6

化合物5(0.019g)をジシクロヘキシルカルボジイミド(0.01g)とともにジクロロメタン(3mL)に溶解し、つづいてN-ヒドロキシサクシニミド(0.006g)を添加した。この混合物を24時間攪拌した。そして、過剰の溶媒を蒸発させた。残留物はエタノールに取り、そして水を加えて沈澱させて白色固体(0.15g)として化合物6を得た。

【0082】7. 化合物7

ビオチニル化グラミシジンA

乾燥、蒸留ジクロロメタン(12mL)中に含まれるグラミシジンA(49mg, 27μmol)、N-BOC-グリシン(48.5mg, 277μmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(28.5mg, 138μmol)および4-(N,N-ジメチルアミノ)-ピリジン(6.5mg, 53μmol)からなる混合物を25分間還流した。そして、室温で20分間冷却し、減圧下

で蒸発乾燥させた。残留物をシリカゲルクロマトグラフィーにかけてジクロロメタン/メタノール/水/酢酸(400:40:4:1)によって溶離して、O-(N-BOC-グリシル)-グラミシジンA(70mg)含有主紫外線活性分画; R_f(CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/AcOH): 0.29を産出した。

【0083】O-グリシルグラミシジンA
O-(N-BOC-グリシル)-グラミシジンA(35mg)を窒素存在下において再蒸留トリフルオロ酢酸(2ml)に溶解した。この溶液を5分間攪拌し、そして蒸発乾燥させた。残留物をベンゼン(4ml)でトリチュレート(triturate)させ、そして蒸発乾燥させた。これによって得られた産物をシリカカラムクロマトグラフィーにかけた。ジクロロメタン/メタノール/水/酢酸(400:40:4:1)によって溶離し、O-グリシルグラミシジンA(33mg)からなるメージャー、極性分画を得た。

【0084】O-(ビオチニル-ε-アミノカプロイル-グリシル)-グラミシジンA
ジクロロメタン/メタノール(2:1、1.5ml)中に含まれるO-グリシルグラミシジンA(16mg)とビオチニル-ε-アミノカプロン酸N-ヒドロキシサクシニミドエステル(3.5mg)とからなる混合物を28時間攪拌し、そして蒸発乾燥させた。残留物をシリカゲルクロマトグラフィーにかけた。ジクロロメタン/メタノール/水(200:30:3)によって溶離し、O-(ビオチニル-ε-アミノカプロイル-グリシル)-グラミシジンA(9mg)を得た。

【0085】ストレプトアビシン・ビオチン複合体を介した伝導性グラミシジンチャンネルへの抗体の結合
グラミシジンイオンチャンネルへ受容体を結合させためのリンカー手段としてストレプトアビシンを利用する一方で、チャンネルの伝導性を維持するために、ストレプトアビシン分子に、チャンネルのクロスリンクを阻止するようにして占有された適当なビオチン結合部位を有するグラミシジン結合ビオチンを結合させることが不可欠である。さらに、ストレプトアビシン分子の反対側のビオチン結合部位は、選択されるビオチニル化受容体の結合のために維持される必要がある。

【0086】そのような形態は、種々の方法によって達成される。そのうちの一つの方法は以下の通りである。

1. 12.5μM濃度となるように添加されたビオチニル化グラミシジンを含む50mg/mlのグリセロールモノオールエート/N-デカン溶液から黒膜(黒脂質膜、BLMと呼ぶ)を形成した。このBLMのインピーダンスを図6において線30で示した。

【0087】2. 図6の線31に示すようなインピーダンスの増加を図るために、10μlのビオチン/ストレプトアビシンのプレフォームした1:1複合体をBLM

に添加した。伝導性ビオチニル化グラミシジンチャンネルによって顕著な残留性コンダクタンスが残った。

【0088】3. 10μlの抗Fc抗体を黒脂質膜に添加した。抗Fc抗体の結合は、図6の線32に示された膜インピーダンスの付随的減少によって明らかである。4. 25μlの抗HCG抗体を黒脂質膜に添加した。抗HCG抗体の抗Fc抗体への結合は、図6の線33および34によって示されたインピーダンスの増加によって明らかである。観察された抗HCG抗体の結合によるインピーダンスの増加は、黒脂質膜においてグラミシジンイオンチャンネルがゲーティングされることの証明である。

【0089】実施例2

N-ダンシル-ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン

クロロホルム/メタノール(3:1、4ml)にジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン(65mg, 0.102mmol)、ダンシルクロライド(37.5mg)およびトリエチルアミン(15μl)を含む混合物を室温で24時間攪拌し、そして蒸発乾燥した。得られた残留物をジクロロメタン(30ml)に溶解し、重炭酸カリウム水溶液(2.5%w/v, 20ml)で洗浄した。有機相を分離し、水相をジクロロメタン(2×10ml)で抽出した。そして、混ざり合った有機相を乾燥(Na₂SO₄)、濾過および乾燥蒸発させた。残留物をシリカカラムクロマトグラフィーにかけて、ジクロロメタン/メタノール(9:1)で溶離させ、黄色蛍光産物(38mg); R_f(CH₂Cl₂/MeOH, 4:1) 0.41を得た。

【0090】実施例3

リンカー脂質

N-4-(4-マレイイミドフェニル)-ブチリルジミリストイルファスファチジルエタノールアミン
クロロホルム/メタノール(4:1, 5ml)にジミリストイルファスファチジルエタノールアミン(64mg)およびトリエチルアミン(14μl)を含む溶液に、固体4-(4-マレイイミドフェニル)-ブチル酸N-ヒドロキシヒドロキシサクシニミドエステル(48mg)を添加し、混合物を室温で2時間攪拌した。この混合物を蒸発乾燥させた後、クロロホルム(30ml)に溶解し、塩化ナトリウム水溶液(1%, 20ml)で2回洗浄し、乾燥(Na₂SO₄)、濾過および乾燥蒸発させた。得られた残留物をシリカカラムクロマトグラフィーにかけて、クロロホルム、クロロホルム/メタノール(95:5)、クロロホルム/メタノール(90:10)およびクロロホルム/メタノール(80:20)で溶離させ、標記化合物(53mg)を得た。

【0091】当業者には容易に理解されるであろうが、反応性に富んだ他のリンカー脂質および受容体の結合のためのスペーサー基は容易に合成されるだろう(J.コ

ーナーら(1985)ファーマコル.セラ(Pharmacol. Ther.)第28巻、341-365)。

【0092】実施例4

一般的な抗原結合表面は種特異的免疫グロブリンG抗Fc抗体、抗体断片またはFcレセプターのFc結合ドメインが自己凝集性両親媒性分子からなる単層または二重層へ、抗Fc分子結合部位が抗体分子を結合可能のようにして配置されるようにして、結合されることによって作られる。抗Fc分子の結合は、グラミシジンのような膜タンパク質また脂質のどちらかに結合した種々のリンカーを用いることによって実行される(実施例1および実施例2を参照)。自己凝集性両親媒性分子からなるバイオレイヤー(生物学的層)は、リポソーム、BLMまたは支持体(サポートイング・サブストレイト)上で生産される。

【0093】この実施例では、多クローン性抗マウス免疫グロブリンG抗Fc抗体を抗Fc分子と両親媒性脂質分子からなる單一ラメラ状リポソーム(小さな單一ラメラベシクル)とを用いる。

【0094】手短に言えば、小さな單一ラメラベシクルはソニケーションおよび超遠心によって調製および分画することが可能である(C. Huang (1969) Biochemistry 8, 344-350; Y. Barenholz, D. Gibbes, B.J. Litman, J. Goll, T.E. Thompson, F.D. Carlson (1977) Biochemistry 16, 2806-10; J. Surrkuusk, B.R. Lentz, Y. Barenholz, R.L. Bittones, T.E. Thomson (1976) Biochemistry, 15, 1393-1401; C.F. Schmidt, D. Lichtenberg, T.E. Thompson (1981) Biochemistry, 20, 4792-97)。

【0095】クロマトグラフィー的に精製された卵黄レシチンおよびコレステロールを1:1の比でもってクロロホルムに溶解した。実施例2に示すようにして合成された蛍光脂質マーカー(Dansyl-PE)を1%モル比となるように混合物に加えた。実施例1および実施例3に示したようにして合成されたリンカー・グラミシジンまたはリンカー脂質を1%モル比で加えた。特に実施例1の化合物6、グラミシジンのN-ヒドロキシーサクシニミド誘導体と、実施例1の化合物7、グラミシジンのビオチン誘導体とが、分離実験に用いられた。溶媒を吸引除去し、脂質はシクロヘキサン:メタノール(95:5)から凍結乾燥した。混合物を100mM磷酸緩衝溶液(PBS)、pH7.9に溶解してボルテックスで攪拌した。脂質分散液をカップホーンソニファイアを固定したブランソンソニファイア(B-12)を用い、氷上で30分間(3分または2分の冷却サイクルでもって)超音波処理した。小さなラメラベシクルを、ベックマンTi75ローターを用いて180,000×g、10°C、90分の条件で超遠心することによって分画した。

【0096】單一ラメラベシクルを含む領域IIIを取り除いた(Y. Barenholz, D. Gibbes, B.J. Litman, J. Goll, T.E. Thompson & F.D. Carlson, (1977) Biochemistry 16, 2806-10)。原料(オリジナルマテリアル)、すなわち1-5μmol全脂質のうちの10%から領域IIIベシクルが形成された。これは、リン脂質濃度(G.R.Bartlett(1959) J.Biol. Chem. 234, 466-468)およびダンシル-PEフルオレッセス、523nmによって決定された。GAまたは誘導体の取り込みは、ベシクルを、セファロースCL4Bおよび蛍光物質ダンシル-PEを含む分画の280nmでのGA吸収を測定することによってさらに分画することによって決定した。ベシクル調製は、ただちに抗体結合に供した。

【0097】抗Fc抗体は、以下の方法でリンカーを有する残基に組み合わされる。抗マウス免疫グロブリンG多クローン性抗Fc抗体と125I標識抗Fc抗体とをベシクル含有100mM磷酸緩衝溶液(pH7.9)に添加した(濃度1-5mg/ml)。(もし、ビオチンがグラミシジンまたは脂質上のリンカーに対して反応性のある基であったとしたら、ストレートアビジョンを抗体に対して1:1のモル比となるようにして添加する。インキュベーションは37°Cで30分、ベシクルを添加する前に実施する)。混合物は、20°Cで12時間インキュベーションする。そして、ベシクルに結合した抗Fc抗体をセファロースCL-4Bクロマトグラフーでもって未結合抗Fc抗体から分離する。抗Fc抗体のベシクルへの結合は、125I標識抗体の特異的活性とダンシル-PEのベシクル内での蛍光を測定することによって決定した。ベシクルに共有的に結合した抗Fc抗体を含む分画は、マウスモノクローン抗体免疫グロブリンG抗体を用いた抗原結合活性のためのラジオイムノアッセイによって調べたところ活性が認められた。

【0098】表面処理

実施例5

非細胞毒性表面は、チタニウム、パラジウム、プラチナ、金または銀のような金属によって被覆された表面にチオール部分を介して両親媒性分子を吸着させることによって調製した。この分子は、天然の脂質またはその誘導体で、例えばスルフヒドリル末端を有するfosfathiolcolin(L.C.Coyl et al. 1989, Chemistry of Materials 1, 606-611)またはチオールを有する合成化合物、例えばアルカン(E.B. Troughton, 1988, Langmuir, 4, 365)またはポリエチレン酸化物のような親水性頭部基を有するアルカン誘導体である。

【0099】この実施例では、アルカン誘導体であるドテカン・チオール、ポリエチレンオキシド・チオールおよびドデカンポリエチレンオキシド・チオールを、高純度蒸留エタノールから金属表面へ合成、吸着して細胞毒性を調べた。

【0100】パラジウム被覆スライドガラスを、真空中で清浄スライドにパラジウムをスパッタリングすること

によって調製した。そして、ただちにチオール脂質／蒸留エタノール溶液に移した。このチオール脂質は、例えば11-メルカプト-3,6,9-トリオクサンデカン1オルと1(12ジミリシトイグルセリル)2(11メルカプト3,6,9-トリオキサンデカン1イル)サクシネート、ドデカンチオルである。チオール脂質被覆スライドガラスの抵抗測定は、細胞毒性試験の前に実施した。

【0101】細胞毒性試験は、チオール脂質被覆スライドガラスへの直接接触24時間後に細胞数および細胞形態を調べることによって行なった。対照群は、未処理のスライドガラスと未処理のパラジウム被覆スライドガラスとを用いた。10%牛胎児血清で増殖させたヒツジ内皮細胞およびマウス線維芽細胞に、チオール脂質被覆スライドガラスを含むスチレン処理細胞培養皿に添加した(それぞれの培養皿に、30,000細胞/cm²)。

【0102】このスライドを36.5°Cで24時間、気圧調整されたオーブン内でインキュベーションした。生体染色および細胞数測定のどちらでも細胞致死が示されなかつた。どちらの場合も、細胞はチオール脂質被覆スライドガラスに粘着しているとともに、細胞培養皿にも粘着していた。

【0103】実施例6

ビトロネクチンまたはファイブロネクチンのような細胞粘着タンパク質に対する抗体は、実施例5のような非細胞毒性チオール脂質被覆スライドガラスに付着する。この付着は、実施例1および3に示したようなアミノ、カルボキシルまたはスルフヒドリル基と反応する脂質上のクロスリンク可能な分子を用いてアミノ酸側鎖、例えばArg、Lys, Asp, GluまたはCysを介してなされる。したがって、内皮または表皮細胞に結合可能な非細胞毒性表面が提供される。また、グラミシジンを添加することによってその表面に電荷伝達能力を与えることができる。

【0104】実施例7

膜ゲーティング装置

黒脂質膜(BLM)装置は、直径が0.5mmの穴が形成された隔壁によって隔てられた2つの10ccチャンバーを有する。これらのチャンバーはBLM溶液とテフロンによって支持されたBLMに穴を有する。ひとつのチャンバーは、10倍の対物レンズのガラスウインドウに固定した。2つのチャンバーはポリアクリルアミド(ペルスペックス)からなるもので、また隔壁はPTFE(テフロン)からなる。チャンバーは、テフロンで絶縁されたステンレススチール製ボルトによって固定されている。ガスケットは、補強されたメデカルグレードのシリコンゴムからなるもので、ペルスペックス部品とテフロン部品とのあいだに設けられる。膜の電気的インピーダンスは、銀／塩化銀電極、リスト LM-EPC 7パッチクランプ増幅器およびコンピューターによって制御された信号発生装置を組み合わせたものによって測定さ

れた。励起(excitation)は0.1Hzから100Hzへ曲線を描いて延びる正弦波である。電圧は20mVにセットされ、そして膜電流増幅は、第6オーダーバンドパスフィルターによって1kHzに制限されたバンド幅を持つ0.5mV/pAにセットされた。

【0105】装置は、蒸留エタノールと、蒸留脱イオン水とによって洗浄された。界面活性剤は洗浄に使用すべきではなく、界面活性剤の痕跡と思われるものはすべて除去した。エタノールの痕跡は真空チャンバー内で部品を吸引することによって除去した。n-デカンに含まれるビオチニル化グラミシジンの12.5μM溶液を調製し、この溶液に100mg/mlのグリセロールモノレートを添加した。シリコンゴム製のチューブを50μlシリソングに固定し、このシリソングに溶液を約10ml満たして隔壁の凸状面にある穴を横切る脂質膜をふく(ワイプ)するのに用いた。この膜は数分のうちにBLMを形成した。

【0106】側方分離ゲートの滴定試験

この測定はアビシン・ビオチニル化グラミシジンゲートを示すために設定されたもので、またゲート機構を示すためのものもある。ストレプトアビシンはビオチンのための4つの結合部位を有しており、滴定の目的は、ひとつ以上の結合部位がビオニチル化グラミシジンチャンネルを阻害するのに必要であるかどうかを調べることである。測定は、一連のストレプトアビシン溶液(ビオチンによって阻害された結合部位が0、1、2、3および4つのもの)によって測定した。

【0107】はじめに、約250メガオームのイオンコンダクタンスを有するBLMをグリセロールモノレート(500mg/ml)とn-デカンに含まれるビオチニル化グラミシジンとからなる溶液から形成した。このBLMを0.1M塩類溶液に浸した。そして、ビオチンとストレプトアビシンとの比がそれぞれ、4、3、8、3.6および3.2:1からなる溶液を、それぞれ10mlずつ連続して、BLMの片側面にある塩類溶液に添加した。その結果、BLMのインピーダンス増加は認められなかった。

【0108】しかし、ビオチンを付着していないストレプトアビシンを他の面上の溶液に添加した場合、インピーダンスは約250メガオームから約12,000メガオームへ上昇した。同様に、モル比3.2:1のもののみを作ったばかりのBLMに添加した場合、インピーダンスは約250メガオームから約8,000メガオームへ上昇した。

【0109】図7は、イオン的に伝導性のあるBLMにストレプトアビシンを添加した場合の基本的なゲート効果を示した。図7では、直線40はストレプトアビシン添加をしていないBLMのインピーダンスを示している。また、直線41はストレプトアビシン添加後のインピーダンスである。

【0110】図8は、ビオチン：ストレプトアビジンの比が4:1（直線43）、3.8:1（直線44）および3.6:1（直線45）からなるそれぞれの混合物を添加した場合の滴定結果である。直線42は、ビオチニル化グラミシン含有BLMのインピーダンスを示すもので、約250メガオームのイオン伝導性が認められた。

【0111】図9は、新鮮なビオチニル化含有グラミシンに3.2:1ビオチン：ストレプトアビジンを添加した場合の効果を示している。図9では、ビオチニル化グラミシンを取り込んだ膜のインピーダンスは直線47で示されており、ストレプトアビジン添加の効果は直線48で示されている。そして、3.2:1ビオチン：ストレプトアビジンの効果は直線49で示されている。

【0112】これらの図では、縦軸にインピーダンスを取り、横軸に周波数を取って、対数でインピーダンスのスペクトルが示されている。インピーダンスの範囲は、10メガオームから100メガオームの範囲で、3.0を通る直線は100メガオームを表わす。周波数の範囲は、1ミリヘルツから100ヘルツで、0.0を通る直線は1ヘルツを表わす。インピーダンススペクトラムのほとんどは、2つの異なる成分からなり、450ラインが膜の容量成分であるスペクトラムの高周波数端で、水平ラインが抵抗成分を表わす。低インピーダンスでは、抵抗成分は完全に容量成分を支配する。高インピーダンスでは、容量成分の変化が起こり、膜の形態変化が起こる一方でイオンチャンネルの変化を示す抵抗の変化が起こる。

【0113】図7は、グリセロールモノオレート(50mg/ml)およびn-デカンに含まれるビオチニル化グラミシン(12.5μM)からなる溶液から形成されたBLMに関するもので、約250メガオームのイオンコンダクタンスが得られた（直線40）。直線41は、膜の両側の溶液に1mg/mlストレプトアビジンを10μl添加したものに関するもので、約12,000メガオームへのインピーダンス増加が認められた。

【0114】図8では、直線42はBLM含有ビオチニル化グラミシンに関するもので、約250メガオームのイオンコンダクタンスが得られた。直線43は、ストレプトアビジンを添加したもので、すべてのビオチン部位がビオチンによってブロックされ、ビオチニル化グラミシンは結合することができないので、コンダクタンスの変化は認められない。同様に、直線44および45はストレプトアビジン上のビオチン結合部位の数が2つ以下であり、インピーダンスの増加は認められない。すなわち、グラミシンの崩壊は起こらない。しかし、インピーダンスの減少は結合が起こったことを示してい

る。非ビオチニル化ストレプトアビジンをBLMの同一側につづけて添加した場合、それ以上のインピーダンス変化は認められず、またゲーティングを伴わない結合が起こった。このことから、ゲーティングは単一の結合にもとづくものというよりもクロスリンクによることがわかった。上記したすべての添加は、膜の片側のみに実施された。ストレプトアビジンをBLMの他の側に添加すると、BLMの他の側のコンダクタンスは約12,000メガオームに増加した。これは、イオンチャンネルゲーティング機構はストレプトアビジンのビオチニル化グラミシンへの結合に影響されないことを示している。すなわち、ストレプトアビジンの競合的結合がゲーティング効果を阻害する唯一のファクターである。

【0115】図9の直線46は、ビオチニル化グラミシンを含むBLMを示しており、イオンコンダクタンスは約250メガオームである。直線47は、ビオチニル化ストレプトアビジン添加の効果を示している。このビオチニル化ストレプトアビジンは、3.2:1ビオチン：ストレプトアビジンとして調製された。これによれば、3.2:1の比で多くの二重結合が可能であることが示されている。インピーダンスの増加は、直線46より上の直線47に示されており、このことは多くのストレプトアビジン分子が3.2:1ビオチン：ストレプトアビジンの比で完全にビオチニル化されている。このことは期待通りである。

【0116】図6は、バイオセンサー膜の調製に該当するインピーダンスのスペクトラムと抗HCG抗体の感知と関係したスペクトラムの変化とを示すものである。ストレプトアビジンは、分子の反対側の極にある接近した対からなるビオチン結合部位からなる4つのビオチン結合単位からなる。ビオチンを共有的に結合したグラミシン含有二重層のコンダクタンスに対するストレプトアビジンの効果は、二重層方向に向いたひとつまたは両方の対応するビオチン結合部位に依存しており、これはグラミシン結合ビオチンに役に立つ。ストレプトアビジン・ビオチン結合部位は、遊離ビオチン分子によってふさがれることによって利用不可能となる。すなわち、ビオチンは他のものには共有的に結合しないことを示している。ビオチンをストレプトアビジンへ添加することは、ビオチンとストレプトアビジンとの比に依存した0、1、2、3または4結合ビオチンを有すストレプトアビジンの2方向分配を必要とする。この分配は表1に示した。

【0117】

【表1】

ビオチン：ストレプトアビジン	%ストレプトビオチン					結合ビオチン
	0	1	2	3	4	
0 : 1	100	0	0	0	0	
1 : 1	31	42	21	5	1	
2 : 1	6	25	38	25	6	
3 : 1	1	5	21	42	31	
3.2 : 1	1	3	15	41	40	
3.6 : 1	1	1	5	29	66	
3.8 : 1	1	1	1	11	81	

【0118】ビオチンを結合していないストレプトアビジンは2つの隣接した結合部位を有するものしか含まれない。また、3つの結合ビオチンを有するストレプトアビジンは、ひとつのビオチン結合部位を有するものしか含まれない。一方、ひとつまたは2つのビオチンはひとつまたはふたつの隣接するビオチン結合部位となる混合物を含む。よって、隣接する利用可能な結合部位に対して過剰な单一結合部位が含まれるストレプトアビジンの試料は、ストレプトアビジンに対して過剰のビオチンを加えることによって調製される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの結合によって、局部的な崩壊によるゲーティングが起こり、膜コンダクタンスは減少する場合を説明するものである。

【図2】 本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって側方配置転換によるゲーティングが起こり、膜コンダクタンスが減少する場合を説明するものである。

【図3】 本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって縦方向の分裂が起こり、膜のコンダクタンスが減少する場合を説明するものである。

【図4】 本発明の第一態様にもとづく膜の概略を示す図で、アナライトの存在によって側方配置転換が起こり膜のコンダクタンスが上昇する場合を説明するものである。

【図5】 修飾されたグラミシジンを合成するための反応スキームを説明するものである。

【図6】 本発明の第一態様にもとづく膜のインピーダンス測定結果を示すものである。

【図7】 本発明の第一態様にもとづく膜のゲーティングを示す実験結果を示すものである。

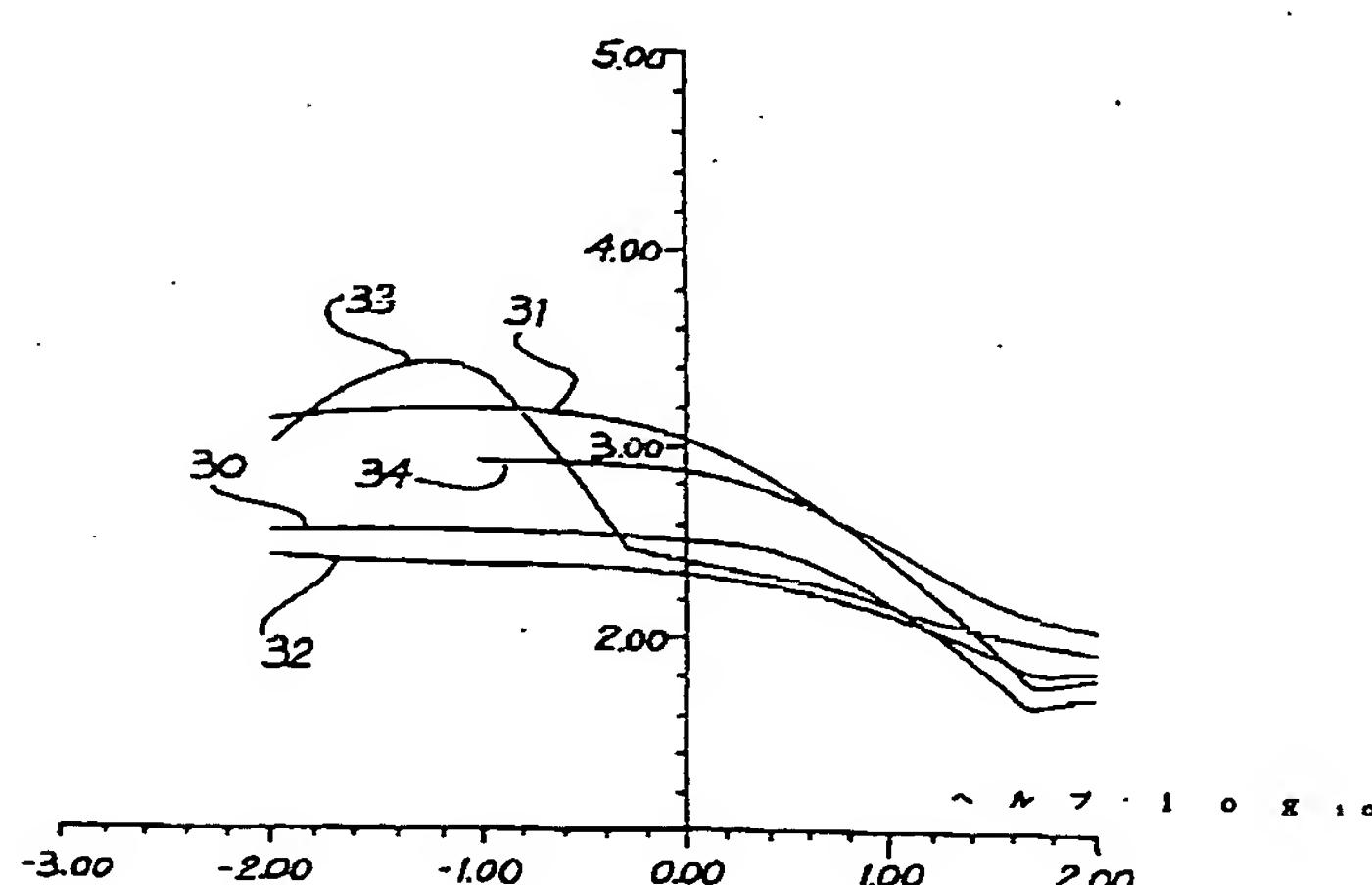
【図8】 本発明の第一態様にもとづく膜のゲーティングを示す実験結果を示すものである。

【図9】 本発明の第一態様にもとづく膜のゲーティングを示す実験結果を示すものである。

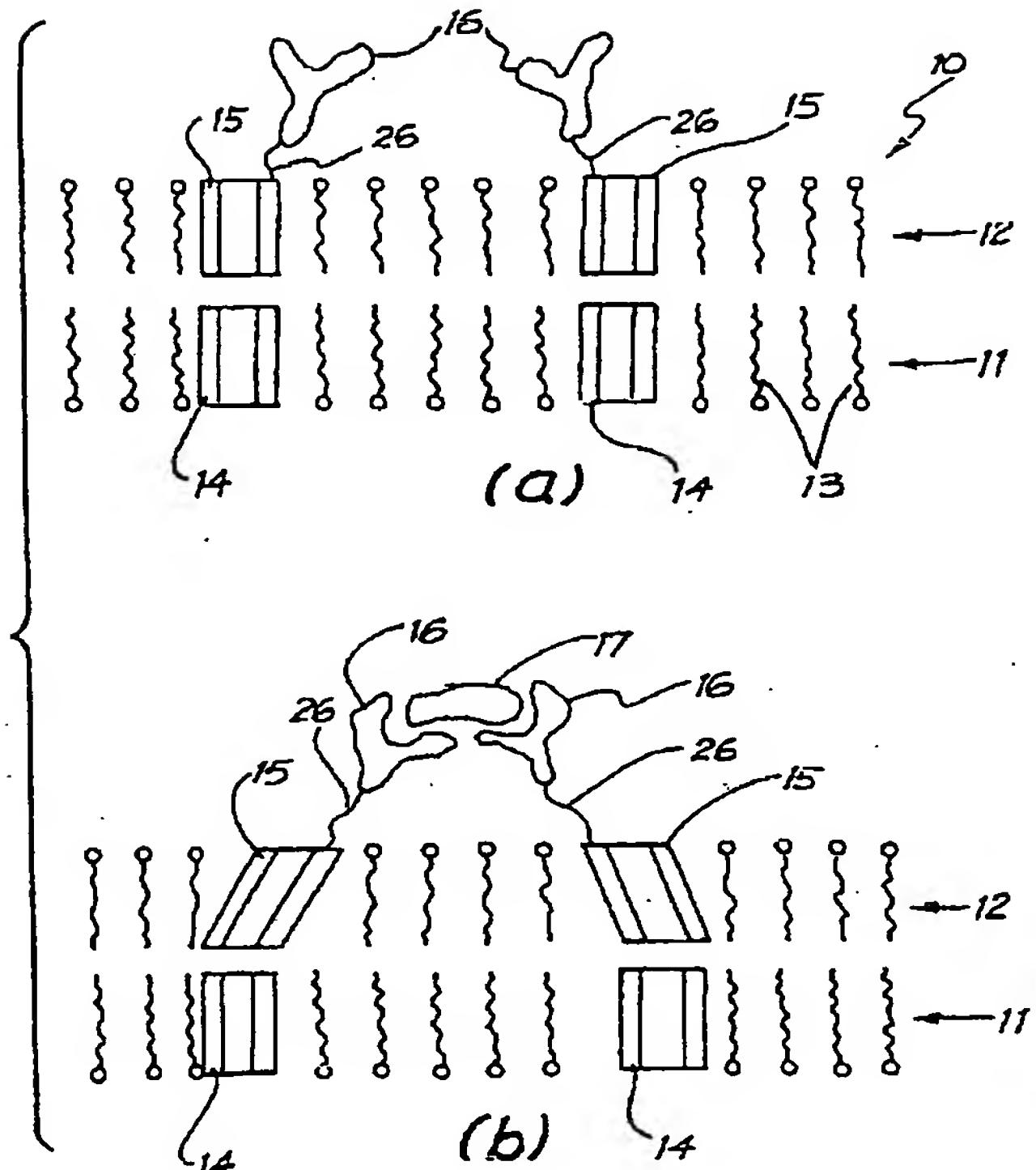
【図6】

フィードバック抵抗は対数スケール上で3である。

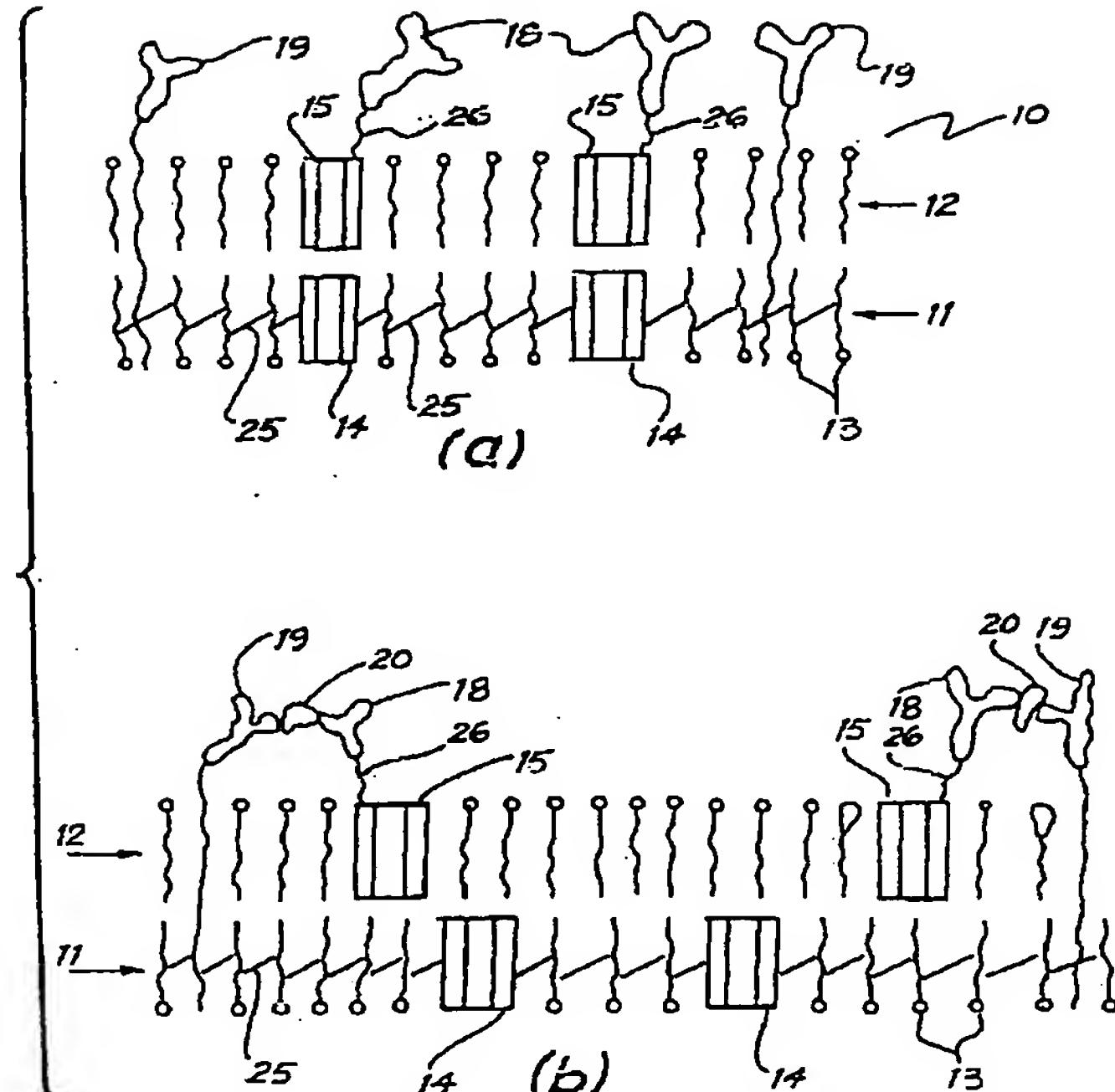
インピーダンス 10⁸ Ω



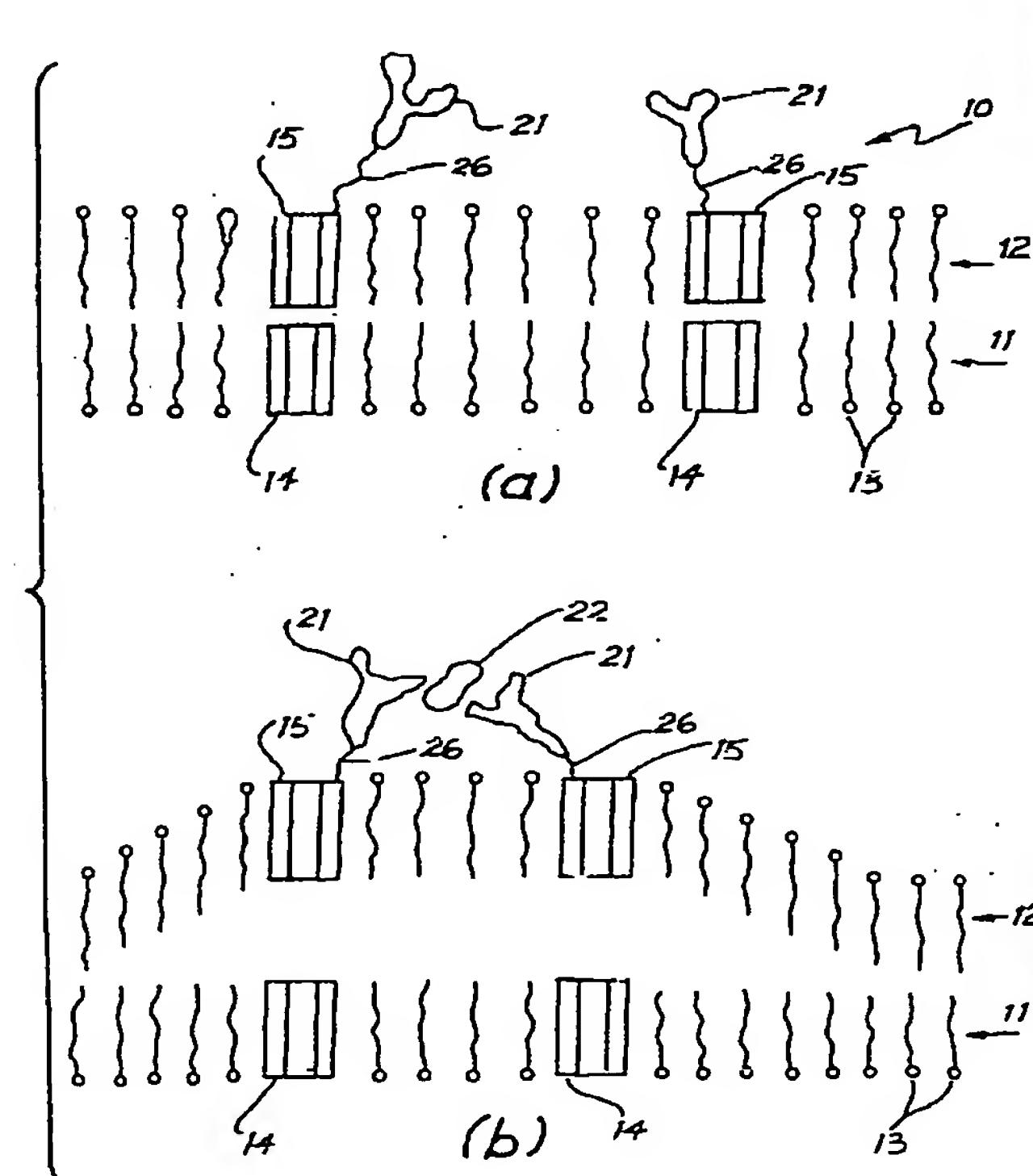
【図1】



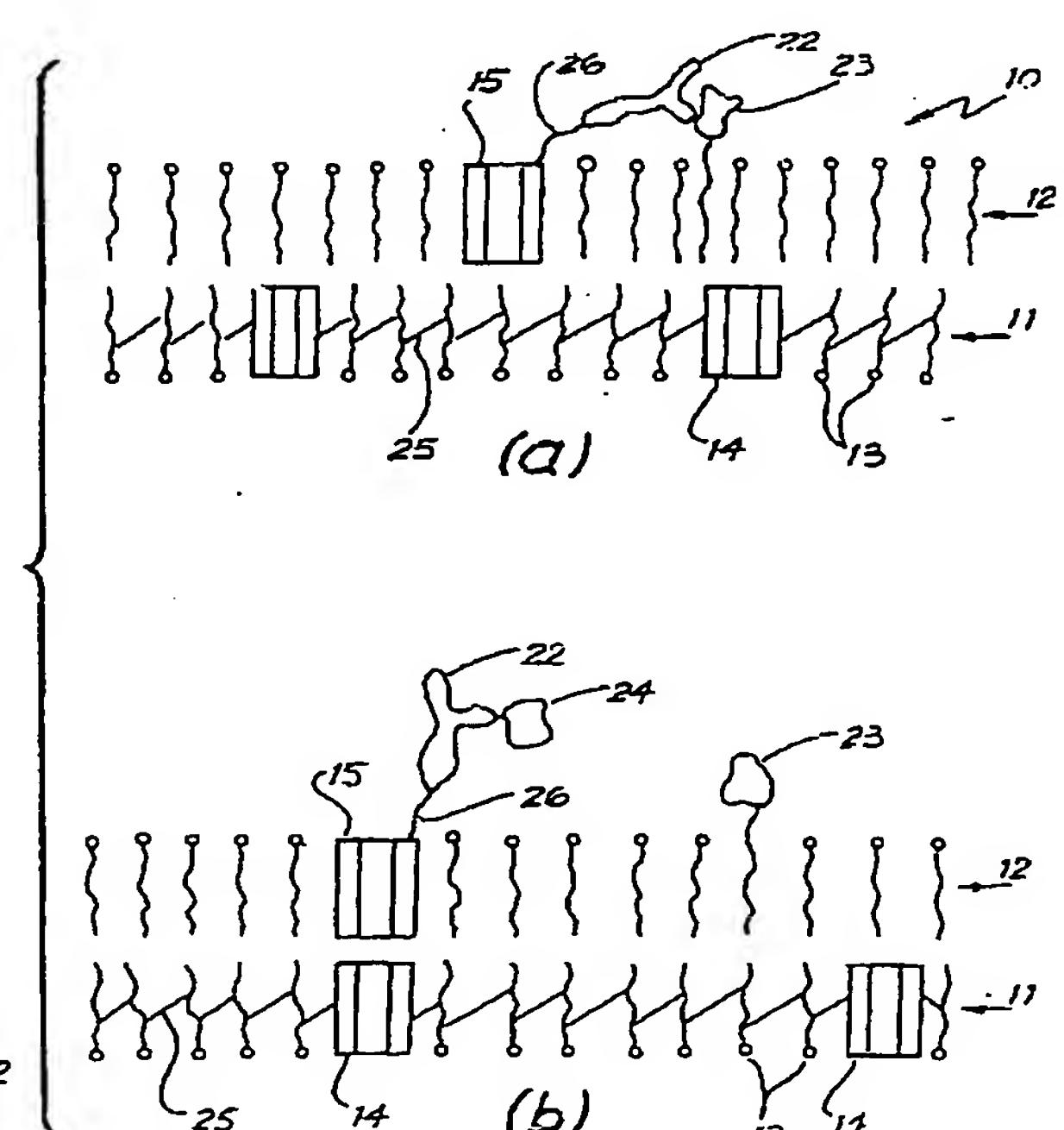
【 2】



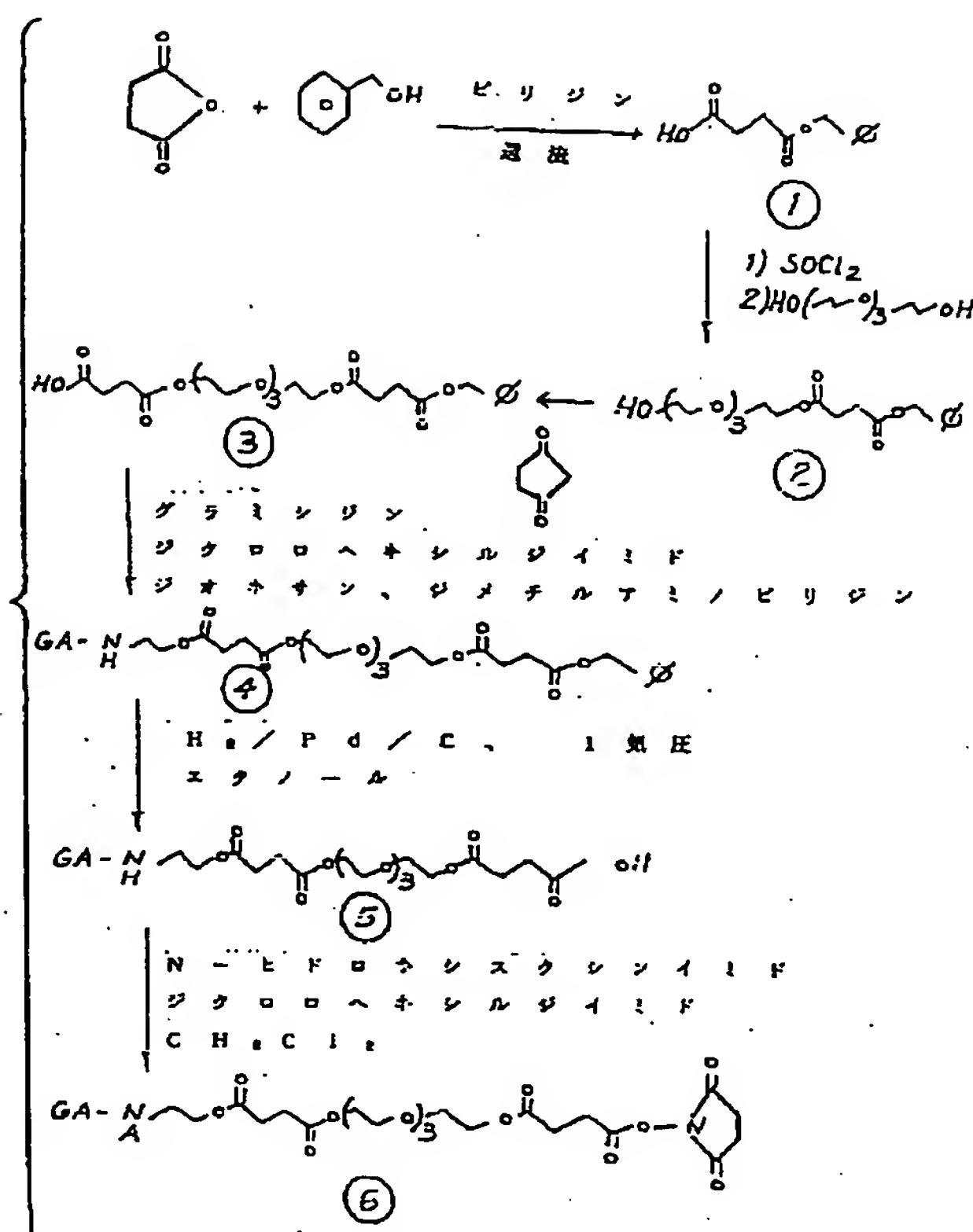
[3]



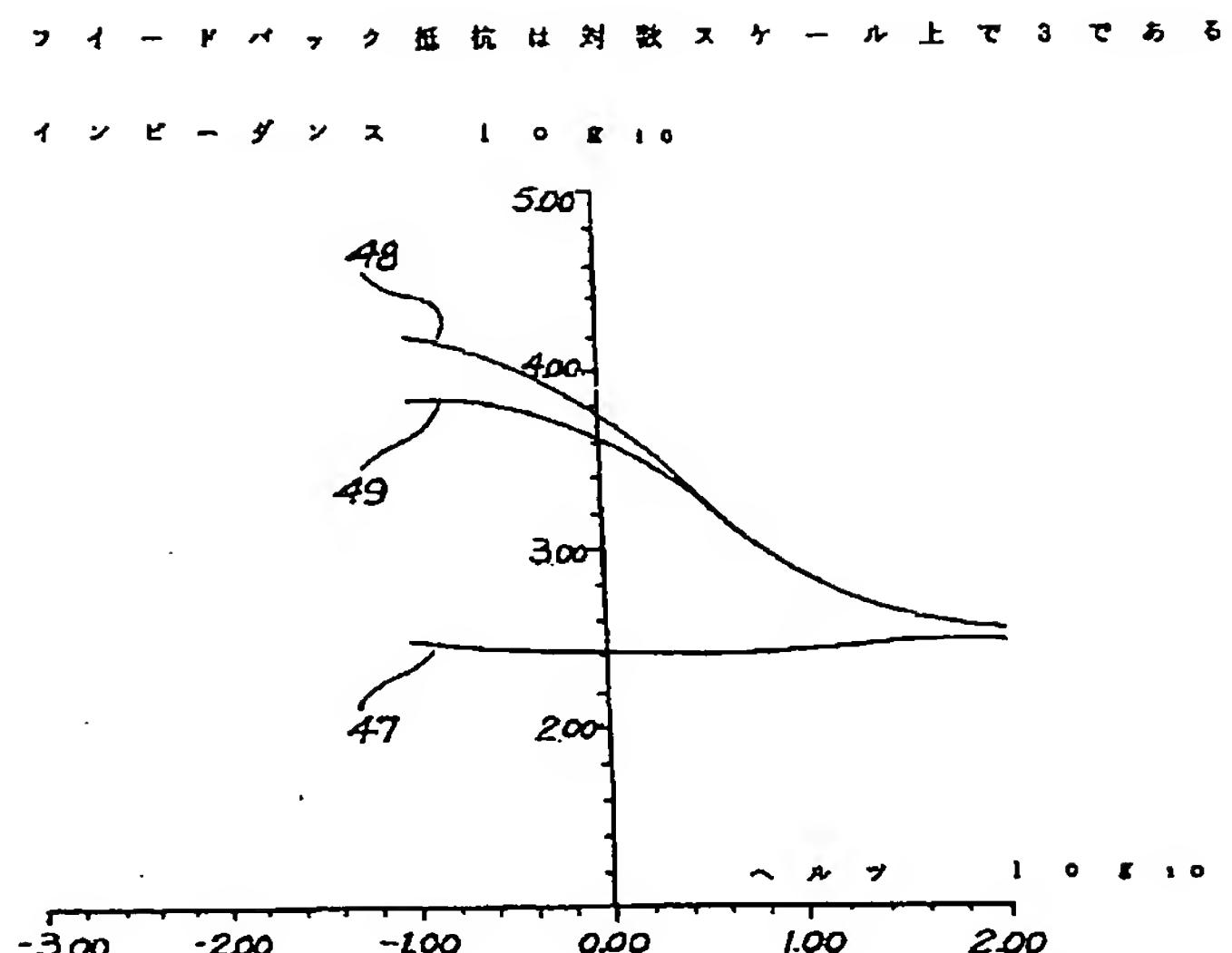
〔图4〕



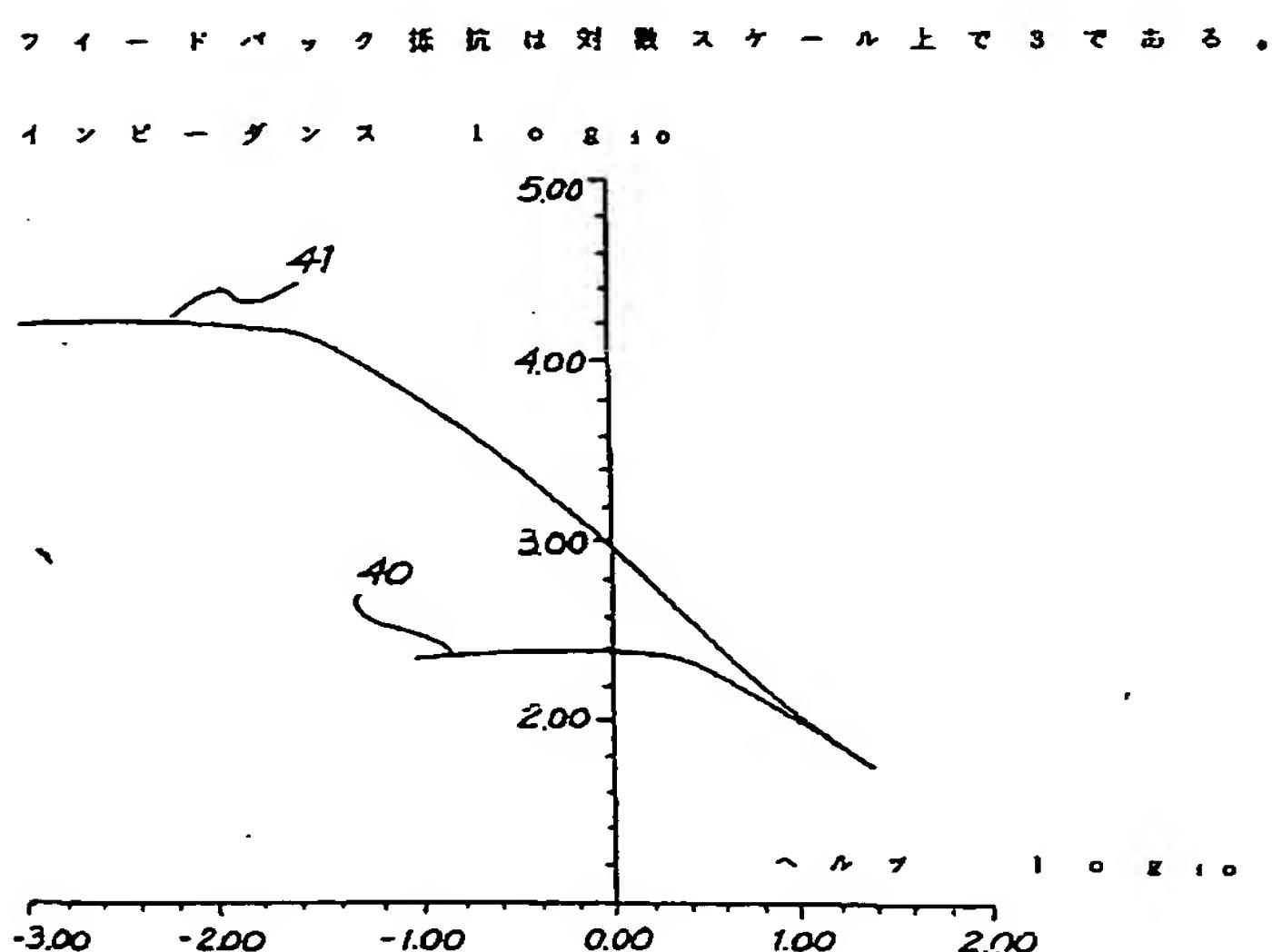
【図5】



【図9】

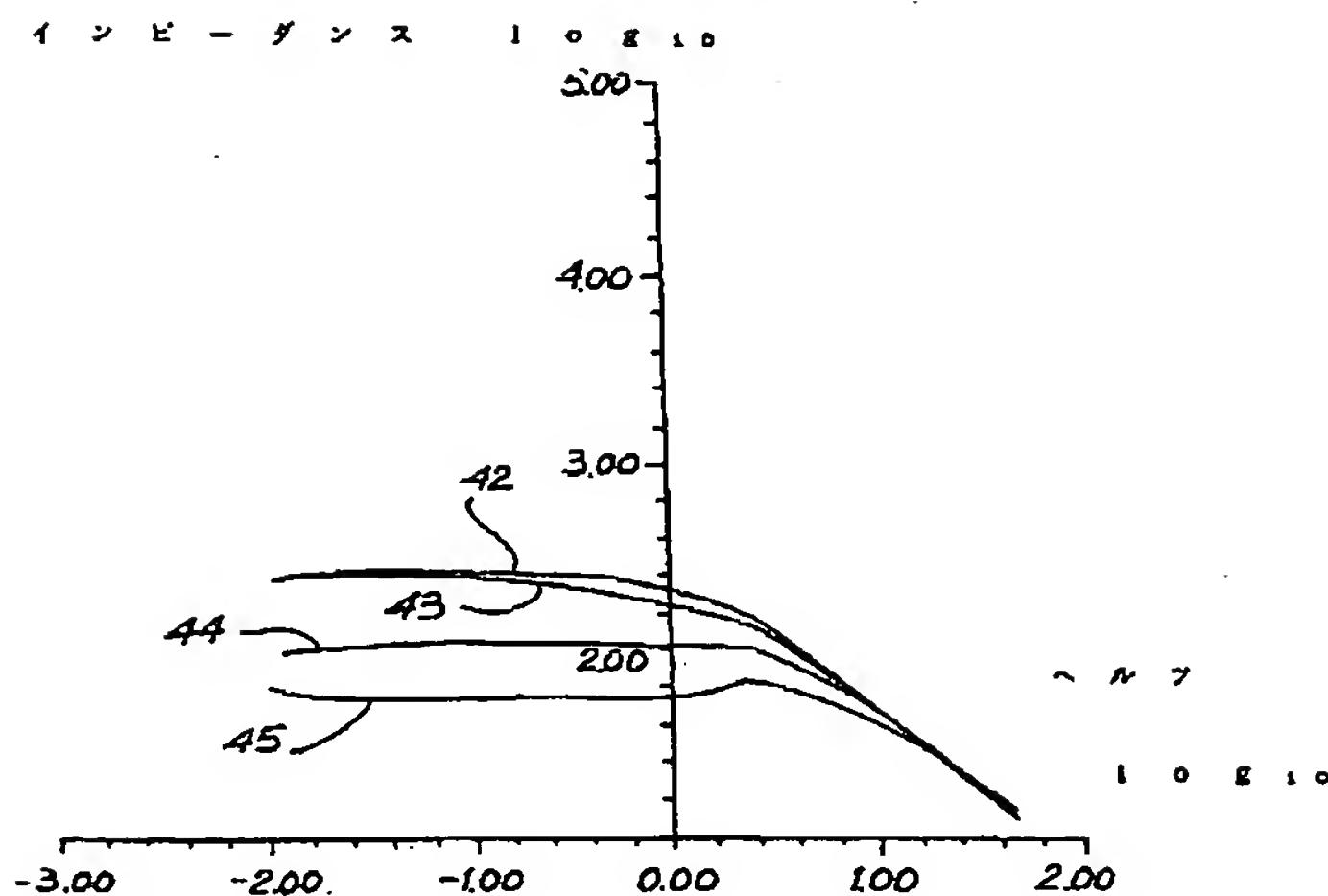


【図7】



【図8】

フィードバック抵抗は対数スケール上で3である。



フロントページの続き

(72)発明者 ブルース・アンドリュー・コーンネル
オーストラリア国・2089・ニュー・サウス・ウェールズ・ニュートラル・ベイ・ウイコム・ロード・58
(72)発明者 ヴィジョレタ・ルシジャ・プロニスラヴァ・プラアクーマクスヴィティス
オーストラリア国・2023・ニュー・サウス・ウェールズ・ベルビューア・ヒル・ビリガ・ロード・11/39
(72)発明者 ロナルド・ジョン・ペース
オーストラリア国・2607・オーストラリアン・キャピタル・テリトリリー・ファラー・ホークスベリー・クレセント・138
(72)発明者 リオネル・ジョージ・キング
オーストラリア国・2122・ニュー・サウス・ウェールズ・マースフィールド・トラファルガー・プレイス・15/5

(72)発明者 バークハーツ・ラギューズ
オーストラリア国・2075・ニュー・サウス・ウェールズ・セント・アイブズ・ムーディーズ・ロード・2
(72)発明者 クレイル・ローズマリー・バックスター
オーストラリア国・2037・ニュー・サウス・ウェールズ・グレブ・ボイス・ストリート・53
(72)発明者 ルース・ミルナ・ホール
オーストラリア国・2038・ニュー・サウス・ウェールズ・ナンデール・ジョン斯顿・ストリート・148
(72)発明者 キャロル・アン・モーリス
オーストラリア国・2049・ニュー・サウス・ウェールズ・ピーターシャム・フォート・ストリート・19
(72)発明者 ピーター・ダミエン・ジョン・オスマン
オーストラリア国・2070・ニュー・サウス・ウェールズ・ウェスト・リンドフィールド・キャラマー・ロード・20